

Université de Sherbrooke

**LA PHOTOTHÉRAPIE MULTI PHOTONIQUE
DES PHTALOCYANINES**

Par

Youssef Mir

Département de médecine nucléaire et de radiobiologie

**Thèse présentée à la faculté de médecine
en vue de l'obtention du grade de
philosophiae doctor (Ph.D.) en médecine nucléaire et radiobiologie**

Soutenue le 3 septembre 2008 devant la commission d'examen :

Dr. François Légaré

Rapporteur externe de l'université

Dr. Denis Morris

Rapporteur externe du programme

Dr. Richard Wagner

Rapporteur interne

Dr. Daniel Houde

Co-Directeur de thèse

Dr. Johan van Lier

Co-Directeur de thèse

Juillet 2008



Library and
Archives Canada

Published Heritage
Branch

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Direction du
Patrimoine de l'édition

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence
ISBN: 978-0-494-48572-9
Our file Notre référence
ISBN: 978-0-494-48572-9

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.


Canada

TABLE DE MATIÈRE

RÉSUMÉ	VI
REMERCIEMENTS	IX
LISTE DES FIGURES	X
LISTE DES TABLEAUX	XIV
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	XV
CHAPITRE I. INTRODUCTION	1
I.1. LA THÉRAPIE PHOTODYNAMIQUE À UN PHOTON	1
<i>I.1.1. Historique médical</i>	<i>1</i>
<i>I.1.1.1. Historique de la photothérapie</i>	<i>1</i>
<i>I.1.1.2. Historique de la photochimiothérapie.....</i>	<i>1</i>
<i>I.1.1.3. Historique de la hématorporphyrine</i>	<i>2</i>
<i>I.1.1.4. Historique des photosensibilisateurs de deuxième et troisième génération</i>	<i>6</i>
<i>I.1.2. Définition générale.....</i>	<i>9</i>
<i>I.1.3. Mécanisme d'action</i>	<i>10</i>
I.2. OXYGÈNE SINGULET	14
<i>I.2.1. Caractéristiques</i>	<i>14</i>
<i>I.2.2. Méthodes de détection.....</i>	<i>17</i>
<i>I.2.2.1. Détection in vitro.....</i>	<i>17</i>
<i>I.2.2.2. Détection in vivo.....</i>	<i>20</i>
I.3. DOMMAGES BIOLOGIQUES PHOTO INDUITS	20
<i>I.3.1. Mécanismes de la TPD au niveau cellulaire.....</i>	<i>20</i>
<i>I.3.2. Détection de mortalité cellulaire.....</i>	<i>22</i>
<i>I.3.2.1. Test MTT</i>	<i>23</i>
<i>I.3.2.2. Test Bleu Trypan</i>	<i>24</i>
<i>I.3.3. Mécanisme de la TPD au niveau tissulaire.....</i>	<i>24</i>
<i>I.3.4. Mécanisme de la TPD au niveau enzymatique.....</i>	<i>26</i>
<i>I.3.4.1. Généralité.....</i>	<i>26</i>

I.3.4.2. <i>L'enzyme acétylcholinestérase</i>	27
I.3.4.3. <i>Excitation à deux photons de l'enzyme acétylcholinestérase</i>	28
I.4. EXPOSÉ DE LA PROBLÉMATIQUE DE LA TPD À UN PHOTON.....	30
I.4.1. <i>Hypoxie de la tumeur</i>	30
I.4.2. <i>Sélectivité des photosensibilisateurs</i>	34
I.4.3. <i>Fenêtre thérapeutique et spécificité de la lumière utilisée</i>	35
I.5. LES PHTALOCYANINES.....	40
I.5.1. <i>Définition et propriétés</i>	40
I.5.2. <i>Rôle du métal central</i>	41
I.5.3. <i>Structure chimique</i>	42
I.5.4. <i>Propriétés biologiques et activité photodynamique</i>	43
I.6. LA TPD À DEUX PHOTONS	43
I.6.1. <i>Définition</i>	43
I.6.2. <i>Excitation à deux couleurs</i>	44
I.6.2.1. <i>Généralité</i>	44
I.6.2.2. <i>Étude photophysique</i>	46
I.6.3. <i>Excitation à une couleur</i>	46
I.6.3.1. <i>Généralité</i>	46
I.6.3.2. <i>Détermination de la section efficace</i>	48
I.7. OBJECTIFS DU PROJET DE RECHERCHE	52
CHAPITRE II. PREMIER ARTICLE.....	54
II.1. BUTS	54
II.2. HYPOTHÈSES	54
TWO-PHOTON ABSORPTION OF COPPER TETRASULFOPHTHALOCYANINE INDUCES PHOTOTOXICITY TOWARDS JURKAT CELLS IN VITRO.....	55
ABSTRACT	56
INTRODUCTION	56
EXPERIMENTAL	59
RESULTS AND DISCUSSION.....	62
CONCLUSION	71

CHAPITRE III. DEUXIÈME ARTICLE	76
III.1. BUTS.....	76
III.2. HYPOTHÈSES.....	76
PHOTODYNAMIC INHIBITION OF ACETYLCHOLINESTERASE FOLLOWING TWO-PHOTON EXCITATION OF COPPER TETRASULFOPHTHALOCYANINE	77
ABSTRACT	78
INTRODUCTION	78
MATERIALS AND METHODS.....	80
RESULTS	82
DISCUSSION	86
CHAPITRE IV. TROISIÈME ARTICLE	94
IV.1. BUTS	94
IV.2. HYPOTHÈSES	94
OXYGEN DEPENDENCE OF TWO-PHOTON ACTIVATION OF ZINC AND COPPER PHTHALOCYANINE TETRASULFONATE IN JURKAT CELLS	95
ABSTRACT	96
INTRODUCTION	96
MATERIALS AND METHODS.....	98
RESULTS	102
DISCUSSION	106
CHAPITRE V. QUATRIÈME ARTICLE.....	112
V.1. BUTS.....	112
V.2. HYPOTHÈSES.....	112
TWO-PHOTON ABSORPTION CROSS SECTION OF EXCITED PHTHALOCYANINES BY A FEMTOSECOND TI-SAPPHIRE LASER	113
ABSTRACT	114
INTRODUCTION	114
MATERIALS AND METHODS.....	117

RESULTS	120
DISCUSSION	122
CHAPITRE VI. DISCUSSION	130
VI.1. ÉTUDE PHOTOCIMIQUE DE LA TPD À DEUX PHOTONS.....	130
<i>VI.1.1. Choix des molécules photosensibilisantes</i>	<i>130</i>
<i>VI.1.2. Spectres d'absorption</i>	<i>131</i>
<i>VI.1.3. Production d'oxygène singulet</i>	<i>132</i>
VI.2. ÉTUDE DE LA TPD À DEUX PHOTONS (DEUX COULEURS) SUR L'ACE	133
VI. 3. ÉTUDE DE LA TPD À DEUX PHOTONS (DEUX COULEURS) SUR LES CELLULES JURKAT	134
<i>VI.3.1. Les cellules Jurkat</i>	<i>134</i>
<i>VI.3.2. Rétention cellulaire.....</i>	<i>135</i>
<i>VI.3.3. Excitation des cellules Jurkat dans un milieu aéré.....</i>	<i>136</i>
<i>VI.3.3.1. Excitation avec des photons en continu.....</i>	<i>136</i>
<i>VI.3.3.2. Excitation avec des photons pulsés.....</i>	<i>136</i>
<i>VI.3.4. Excitation des cellules Jurkat dans un milieu hypoxique</i>	<i>138</i>
VI.4. MÉCANISME D'EXCITATION À DEUX PHOTONS (DEUX COULEURS)	140
VI.5. ÉTUDE DE L'ABSORPTION À DEUX PHOTONS (UNE COULEUR).....	141
CHAPITRE VII. CONCLUSION	148
RÉFÉRENCES	150

RÉSUMÉ

La thérapie photodynamique (TPD) du cancer est un traitement par irradiation photonique destinée à certains types de tumeur aussi bien que d'autres maladies non oncologiques. Elle combine trois paramètres : le photosensibilisateur (Ps), l'oxygène moléculaire et la lumière de longueur d'onde appropriée. Après localisation du Ps dans le tissu cible, la production de différentes espèces oxygénées réactives (EOR) pourrait, suite à l'administration de la lumière, causer des mortalités cellulaires et des dommages vasculaires. La TPD peut aussi activer le système immunitaire qui à son tour affecterait les cellules tumorales. Le Ps photo-excité pourrait réagir via le mécanisme type I ou type II. Dans le mécanisme de type I, le Ps excité réagit avec les molécules de substrat ou le solvant via l'abstraction de l'hydrogène ou le transfert d'électron pour donner des espèces ioniques ou radicalaires. Ces dernières réagiront ensuite avec les molécules d'oxygène pour donner des EOR. Dans le mécanisme de type II, le Ps excité réagit directement avec l'oxygène qui est dans l'état fondamental triplet pour donner de l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$). Le type II est le mécanisme le plus largement accepté en littérature conduisant à la mortalité cellulaire.

Toutefois, tel qu'elle est actuellement pratiquée, la TPD se heurte à un obstacle : l'anoxie du coeur des tumeurs. Ceci rend le traitement partiellement inefficace malgré une rétention sélective des Ps dans les tumeurs, celle-ci étant insuffisante puisque le patient devient photosensible pendant une période de quelques jours après le traitement. De plus, le manque de précision des méthodes d'illumination utilisées cause des dommages latéraux irréversibles aux tissus sains qui sont adjacents. Par ailleurs, les Ps utilisés (Photofrin) en clinique absorbent la lumière à une longueur d'onde (630 nm) en dehors de la fenêtre thérapeutique. Ceci limite la pénétration de la lumière à travers les tissus ce qui rend la TPD moins efficace pour le traitement des tumeurs profondes.

Pour contourner ces inconvénients, la méthode proposée est l'excitation des molécules de Ps via une activation à deux photons ($2-\gamma$). Cette méthode fait appel à l'optique linéaire en utilisant des sources laser continus et non linéaires comme des sources laser courts (en nanosecondes) et ultracourts (en femtosecondes). La première méthode est basée sur une excitation du Ps par $2-\gamma$ séquentiels (deux couleurs) pour traiter des tumeurs cancéreuses, alors que la deuxième méthode est basée sur une excitation simultanée en utilisant des sources laser qui émettent une lumière dans le proche infrarouge (NIR). Cette deuxième technique vise à traiter ou

à occlure des néovaisseaux qui poussent au centre de la rétine pour un éventuel traitement de la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA). Les Ps utilisés dans ce projet sont des molécules de phtalocyanine (Pc) qui ont été synthétisées dans notre laboratoire et qui ont démontré leur efficacité dans la TPD monophotonique.

Ce projet est divisé en deux parties :

L'objet de la première partie est le développement d'une méthode expérimentale *in vitro* qui nous permettra d'étudier la faisabilité de la TPD à 2- γ pour traiter des cellules cancéreuses en milieu hypoxique (appauvrissement en oxygène). L'hypothèse de base de cette étude est que les molécules de Ps, une fois excitées séquentiellement par 2- γ , passent à des états excités supérieurs. Une molécule dans un tel état pourrait réagir selon la chimie des états excités supérieurs, plus riche, et pourrait être indépendante de l'oxygène.

La méthodologie suivie consistait à irradier, par un photon (1- γ) et 2- γ , deux entités biologiques (cellules et enzymes) incubées avec le Ps phtalocyanine du cuivre tétrasulfoné (CuPcS₄). Les sources de lumière utilisées sont des émetteurs laser qui produisent des photons pulsés (la durée d'impulsion est huit nanosecondes) et continus. Nos résultats ont démontré que le concept de la TPD à 2- γ sur les cellules cancéreuses Jurkat et l'enzyme acétylcholinestérase (ACE) fonctionne en accord avec les propriétés photophysiques du CuPcS₄. Les dommages photo induits observés ne dépendent pas de ¹O₂ (principal médiateur dans la TPD à 1- γ). Cela veut dire que la TPD à 2- γ pourrait contourner, du moins en partie, les limitations de la TPD conventionnelle reliée à l'hypoxie des tumeurs.

Dans le cadre de ce projet, nous avons aussi adapté un nouveau protocole d'irradiation des cellules dans un milieu dont le niveau d'oxygène pouvait être finement régulé. Cette procédure permettrait de manipuler et d'irradier des cellules ou des biomolécules stériles dans un environnement hypoxique, méthode qui a été pertinente, puisqu'elle nous a permis de quantifier la concentration de ¹O₂ produite par deux Ps, CuPcS₄ et ZnPcS₄, et d'en faire la comparaison à différents niveaux d'oxygène moléculaire.

La deuxième partie de ce projet de recherche visait à déterminer le potentiel de nouveaux Ps comme agents actifs pour la TPD à 2- γ , par des impulsions laser ultracourts (~ 100 femtosecondes), pour le traitement de la DMLA. L'avantage de ce protocole d'irradiation est que les sources laser utilisées émettent des rayons dans le NIR. Ainsi, la lumière pourrait traverser les

tissus sains de façon inoffensive et exciter le Ps qui est en circulation dans les néovaisseaux rétiniens. La méthodologie de cette partie consistait à mesurer la section efficace (σ_2) d'une série de Pc et le Photofrin. Ce dernier est le Ps archétypique le plus utilisé en clinique pour traiter différentes tumeurs. Les résultats trouvés montrent que les Pc sont beaucoup plus efficaces en termes de capacité d'absorption à 2- γ . Les Pc sont des bons candidats et leur efficacité dépasse largement celle des Photofrins. On a ainsi repéré un Pc (ZnPcS₄) qui a une σ_2 dix fois supérieure qu'au Photofrin. De plus, le ZnPcS₄ est déjà testé pour traiter la DMLA par la TPD monophotonique et ses caractéristiques pharmacocinétiques, photochimiques et photophysiques en font un candidat potentiel pour la TPD à 2- γ .

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier mes directeurs de thèse, Dr. Daniel Houde et Dr. Johan van Lier, de m'avoir accueillie dans leurs équipes respectives. Je voudrais aussi les remercier pour le temps qu'ils m'ont accordé et la patience qu'ils m'ont montrée tout au long de ces années, d'avoir cru en mes capacités et de m'avoir fourni d'excellentes conditions de travail matérielles et financières. De plus, les conseils qu'ils m'ont prodigués tout au long de ce travail, ainsi que leurs collaborations durant les étapes de recherche, d'expérience et de rédaction des articles m'ont facilité grandement la tâche et m'ont permis d'aboutir à la réalisation de cette thèse.

Je remercie l'Institut canadien pour les innovations en photonique pour son support financier.

Je voudrais vivement remercier Dr. Denis Morris de nous avoir permis d'utiliser son laboratoire et le système Ti-saphir pour les mesures de la fluorescence à deux photons, ainsi que sa collaboration dans le quatrième article.

Je remercie également Dr. Benoit Paquette de nous avoir permis d'utiliser ces appareils de mesure de l'absorbance et la pression de l'oxygène, ainsi que sa collaboration dans le troisième article.

Je voudrais remercier Dr. François Légaré, Dr. Denis Morris et Dr. Richard Wagner pour avoir accepté de juger ce travail et pour l'intérêt qu'ils y ont manifesté.

Je remercie tous ceux qui, d'une façon ou d'une autre, ont contribué à la réalisation de ce travail, et je cite en particulier Jean-François Allard pour les discussions sur le laser, Carole La Madeleine et Nicole Cauchon pour leurs conseils sur tout ce qui concerne la culture cellulaire.

J'adresse mes plus sincères remerciements à mes parents

LISTE DES FIGURES

FIGURE I.1 PHOTSENSIBILISATION CUTANÉE INDUITE CHEZ LE DR. MEYER BETZ SUITE À L' AUTO INJECTION DE 200 MG DE HP ET L' EXPOSITION À LA LUMIÈRE DU SOLEIL	3
FIGURE I.2 MÉCANISME D'EXCITATION DU PS PAR DES PHOTONS EN CONTINU, FL = FLUORESCENCE, PH = PHOSPHORESCENCE, CIS = CONVERSION INTER SYSTÈME. (DE ROSA ET CRUTCHLEY, 2002; SHERMAN ET AL., 2000; CASTANO ET AL., 2004).....	12
FIGURE I.3 MÉCANISME D' ACTION PHOTODYNAMIQUE DE TYPE III (LAUSTRIAT, 1986; STIEL ET AL, 1994).....	12
FIGURE I.4 MÉCANISME D' ACTION DE LA TPD (DE ROSA ET CRUTCHLEY, 2002; SHARMAN ET AL., 2000; CASTANO ET AL., 2004)	14
FIGURE I.5 DIAGRAMME D'ÉNERGIE QUI PRÉSENTE LE MÉCANISME DE GÉNÉRATION DE L' OXYGÈNE SINGULET VIA LES ÉTATS EXCITÉS SINGULET ET TRIPLET DES MOLÉCULES DE COLORANT (KRASNOVSKY, 2007)	15
FIGURE I.6 SCHÉMA DES TRANSITIONS ÉLECTRONIQUES ENTRE L'ÉTAT FONDAMENTAL ET LES FAIBLES ÉTATS SINGULETS DE LA MOLÉCULE D' OXYGÈNE. LE NOMBRE ENTRE PARENTHÈSES REPRÉSENTE LES TRANSITIONS VIBRATIONNELLES.	16
FIGURE I.7 RÉACTION DU 9, 10-DIPHENYLANTHRACÈNE AVEC $^1\text{O}_2$	19
FIGURE I.8 COURBE D' ABSORBANCE DU DPA DANS LE DMF À UNE CONCENTRATION DE 50 MM	20
FIGURE I.9 MÉCANISME D' EFFET ANTI TUMORAL INDUITS PAR LA TPD À 1- γ (NOWIS ET AL., 2005A).....	22
FIGURE I.10 RÉACTION DE L' ENZYME MITOCHONDRIAL AVEC LE MTT.....	23
FIGURE I.11 STRUCTURE DE LA MOLECULE DE TRYPAN BLEU.....	24
FIGURE I.12 DIAGRAMME D'ÉNERGIE PROPOSÉ POUR L' EXCITATION DE LA MOLÉCULE DU ROSE BENGAL (LAMBERT ET AL., 1999)	29
FIGURE I.13 SCHÉMA D' UNE TUMEUR SOLIDE	32
FIGURE I.14 COURBE D' ABSORPTION DE L' HÉMOGLOBINE OXYGÉNÉE (HbO_2) ET NON OXYGÉNÉE (Hb) ET DE L' EAU (LICHA ET OLBRICH, 2005)	36
FIGURE I.15 STRUCTURE TYPIQUE DES PC OÙ M EST UN ION MÉTALLIQUE CENTRAL (AL, CO, CU, FE, GA, NI, SI OU ZN) ET R REPRÉSENTE UNE MULTITUDE DE SUBSTITUANTS PÉRIPHÉRIQUES DONT SO_3H , F, COOH , ETC.	41
FIGURE I.16 MÉCANISMES DES DEUX DIFFÉRENTES FORMES DE LA TPD À 2- γ	44

FIGURE II.1 ENERGY LEVEL DIAGRAM FOR CuPcS ₄	58
FIGURE II.2 GROUND-STATE AND TRANSIENT ABSORPTION SPECTRA FOR CuPcS ₄	58
FIGURE II.3 METALLO SULFOPHTHALOCYANINE. CuPcS ₄ : M=Cu, R=SO ₃ Na; ZnPcS ₄ : M=Zn, R=SO ₃ Na; ZnPcS ₂ : M=Zn, 2(R)=H AND 2(R)=SO ₃ Na ON ADJACENT BENZYL RINGS.	59
FIGURE II.4 ABSORPTION SPECTRA OF 20 μM CuPcS ₄ (A) AND 20 μM ZnPcS ₄ (B) IN DIFFERENT SOLVENTS.	63
FIGURE II.5 VIABILITY OF JURKAT CELLS INCUBATED WITH DIFFERENT PS FOLLOWING CONTINUOUS IRRADIATION WITH RED LIGHT. CELLS WERE INCUBATED WITH 9 mM OF PS, PLACED IN 96 MICRO-WELL PLATES AND IRRADIATED FOR 30 MIN WITH 660-700 NM RED LIGHT (FLUENCE 18 J CM ⁻²). INCUBATION TIMES POST- AND PRE-IRRADIATION WERE SET AT 24 H. CELL SURVIVAL WAS MEASURED BY THE MTT COLORIMETRIC ASSAY.....	66
FIGURE II.6 VIABILITY OF JURKAT CELLS AFTER INCUBATION WITH CuPcS ₄ (60 μM) IN DIFFERENT TOTAL VOLUMES (A: 2 mL; B: 1.25 mL; C: 1 mL). CONTROL CELLS WERE KEPT IN THE DARK, IRRADIATED CELLS WERE EXPOSED TO PULSED-LIGHT AT 532 NM, 8 NS INTERVALS (FLUENCE 12.8 J CM ⁻²). INCUBATION TIMES POST- AND PRE-IRRADIATION WERE SET AT 24 H. CELL SURVIVAL WAS MEASURED BY THE MTT COLORIMETRIC ASSAY.	67
FIGURE II.7 VIABILITY OF JURKAT CELLS AFTER INCUBATION WITH DIFFERENT CONCENTRATIONS OF CuPcS ₄ (TOTAL VOLUME 2 mL) FOLLOWING IRRADIATION WITH PULSED-LIGHT AT 532 NM, 8 NS INTERVALS (FLUENCE 17.6 J CM ⁻²). INCUBATION TIME POST- AND PRE-IRRADIATION WERE SET AT 24 H. CELL SURVIVAL WAS MEASURED BY THE MTT COLORIMETRIC ASSAY.	68
FIGURE II.8 PROPOSED PATHWAYS TO POPULATE THE TRIPLET EXCITED T _N STATE OF CuPcS ₄ ; FL = FLUORESCENCE, ISC = INTERSYSTEM CROSSING, IC = INTERNAL CONVERSION.....	70
FIGURE III.1 THE IRRADIATION PROBE EXPERIMENTAL SETUP. L _B BICONVEX LENS, L _C CYLINDRICAL LENS, PD _T PHOTODIODE TEST, PD _R = HOTODIODE REFERENCE, N ₂ NITROGEN GAS, GS GLASS SLIDE, A ATTENUATOR, F FILTER, F1 450FS10-25, F2 500FS80-25. AFTER IRRADIATION WITH 514- AND/OR 670-NM CW LIGHT, F2 IS REPLACED BY TWO FILTERS 3 (400FS70-25) AND 4 (450FS40-25) TO PROVIDE THE 455-NM PROBE LIGHT TO QUANTIFY TNB PRODUCTION. THE TWO CW BEAMS OVERLAP AND ILLUMINATE THE ENTIRE QUARTZ CELL...	81
FIGURE III.2 TNB PRODUCTION USING THE ELLMAN PROCEDURE TO ESTIMATE ACE ACTIVITY. ACE IN THE PRESENCE OF CuPcS ₄ AND AIR WAS EXPOSED TO 514- AND 670-NM CW LIGHT EITHER SEPARATELY OR SIMULTANEOUSLY, FOR 45 MIN. THE REMAINING ACE ACTIVITY WAS	

MEASURED BY FOLLOWING THE CONVERSION OF DTNB TO TNB USING THE ELLMAN PROCEDURE. THE TNB PRODUCTION CURVE OVER THE INITIAL 1.2 MIN WAS USED TO CALCULATE THE INITIAL TNB PRODUCTION RATE THAT, IN TURN, SERVED AS A PARAMETER TO ESTIMATE THE ACE CONCENTRATION	83
FIGURE II.3 INITIAL VELOCITY OF TNB PRODUCTION AS A FUNCTION OF THE ACE CONCENTRATION. DIFFERENT CONCENTRATIONS OF ACE WERE INCUBATED AT ROOM TEMPERATURE, IN THE DARK, WITH ACETYLTIOCHOLINE IN THE PRESENCE OF CuPcs ₄ AND ELLMAN REAGENT. THE TNB CONCENTRATION WAS MEASURED SPECTROPHOTOMETRICALLY A DURING THE FIRST 20 S AND B AFTER 30 MIN OF INCUBATION AT ROOM TEMPERATURE	84
FIGURE III.4 THE EFFECT OF 1- γ AND 2- γ PDT ON ACE ACTIVITY. ACE IN THE PRESENCE OF CuPcs ₄ AND AIR WAS EXPOSED TO 514- AND 670-NM CW LIGHT EITHER SEPARATELY OR SIMULTANEOUSLY FOR DIFFERENT TIME PERIODS. THE ACE ACTIVITY WAS SUBSEQUENTLY MEASURED BY THE ELLMAN PROCEDURE, A USING THE INITIAL TNB PRODUCTION RATE AND B AFTER 30 MIN USING THE TOTAL AMOUNT OF TNB PRODUCED. EACH DATA POINT REPRESENTS THE AVERAGE OF FOUR TO SIX DIFFERENT EXPERIMENT AND THE ERROR BARS IN THE FIGURES REPRESENT STANDARD DEVIATION OF THE MEAN	85
FIGURE III.5 COMPARISON OF THE ACE INACTIVATION AFTER 2- γ PDT AND THE COMBINED 1- γ PDT EFFECTS WITH 514 AND 670 NM, FOLLOWING DIFFERENT IRRADIATION TIMES, A USING THE INITIAL TNB PRODUCTION RATE AND B USING THE TOTAL AMOUNT OF TNB PRODUCED AFTER 30 MIN OF INCUBATION AT ROOM TEMPERATURE. DATA WERE TAKEN FROM FIGURE III.4A AND 4B RESPECTIVELY	86
FIGURE III.6 PROPOSED PATHWAYS TO PRODUCE ROS AFTER POPULATION OF THE TRIPLET EXCITED T _N STATE OF CuPcs ₄ WITH SEQUENTIAL 2- γ , CW IRRADIATION WITH 670- AND 514-NM LASER LIGHT; FL = FLUORESCENCE, ISC = INTERSYSTEM CROSSING, IC = INTERNAL CONVERSION, PH=PHOSPHORESCENCE	89
FIGURE IV.1. ELIMINATION OF O ₂ AS FUNCTION OF TIME PURGING WITH N ₂ . THE PO ₂ WAS MEASURED BY ISO ₂ CONTINUOUSLY WITH PURGING 2 ML OF PBS IN THE ANAEROBIC CUVETTE WITH N ₂ . EACH DATA POINT REPRESENTS THE AVERAGE OF AT LEAST TEN DIFFERENT EXPERIMENTS AND THE ERROR BARS IN THE FIGURE REPRESENT STANDARD DEVIATION OF THE MEAN.....	100

FIGURE IV.2. SINGLET OXYGEN CONCENTRATION FORMED BY 4 μM OF ZnPcS_4 IN DMF AT DIFFERENT PO_2 . EACH DATA POINT REPRESENTS THE AVERAGE OF AT LEAST TEN DIFFERENT EXPERIMENTS AND THE ERROR BARS IN THE FIGURES REPRESENT STANDARD DEVIATION OF THE MEAN.	102
FIGURE IV.3. VIABILITY OF JURKAT CELLS INCUBATED WITH A) ZnPcS_4 AND B) CuPcS_4 FOLLOWING DIFFERENT IRRADIATION CONDITION. CELLS WERE INCUBATED WITH 10 mM OF PS, PLACED IN ANAEROBIC CUVETTE AND IRRADIATED WITH 1- γ OR 2- γ AT FLUENCE OF 320 J cm^{-2} . EACH DATA POINT REPRESENTS THE AVERAGE OF AT LEAST TEN DIFFERENT EXPERIMENTS AND THE ERROR BARS IN THE FIGURES REPRESENT STANDARD DEVIATION OF THE MEAN.	105
FIGURE V.1 MPC STRUCTURE. ZnPc : $\text{M} = \text{Zn}$, $\text{R} = \text{H}$; ZnPcS_4 : $\text{M} = \text{Zn}$, $\text{R} = \text{SO}_3\text{Na}$; ZnPcS_3C_9 : $\text{M} = \text{Zn}$, $\text{R} = \text{SO}_3\text{Na}$ (3x) AND $\text{R} = \text{C}_2(\text{CH}_2)_6\text{CH}_3$ (1x); ALPcCL : $\text{M} = \text{AlCl}$, $\text{R} = \text{H}$; $\text{ALPcS}_{2\text{ADJ}}$: $\text{M} = \text{Al}$, $\text{R} = \text{H}$ (2x) AND $\text{R} = \text{SO}_3\text{Na}$ (2x) ON ADJACENT BENZYL RINGS.....	117
FIGURE V.2 SCHEMATIC OF EXPERIMENTAL SETUP: M: MIRRORS; OD: OPTICAL DENSITY; L: LENS; PM: PHOTOMULTIPLIER	120
FIGURE V.3 EXAMPLE OF PLOT OF INTEGRATED FLUORESCENCE INTENSITY AS FUNCTION OF ABSORBANCE FOR PHOTOFRIN IN METHANOL	122
FIGURE V.4 ABSORPTION SPECTRA OF 10 μM MPC ($\text{ALPcS}_{2\text{ADJ}}$, ALPcCL , ZnPcS_3C_9 , ZnPcS_4) AND PHOTOFRIN.	125
SCHEME V.1 SCHEMATIC DIAGRAM OF THE EXCITATION PATHWAYS OF THE CUVETTE BY A FOCUSED LASER: R_1 AND R_2 ARE THE BEAM RAY AT SIDE 1 AND 2 RESPECTIVELY AND Θ IS THE ILLUMINATION ANGLE	125
FIGURE VI.1 COURBE LN-LN DE L'INTENSITÉ DE FLUORESCENCE À DEUX PHOTONS (FDF) EN FONCTION DE L'INTENSITÉ D'EXCITATION INCIDENTE POUR A) Rh6G , B) ALPcCL , C) $\text{ALPcS}_{2\text{ADJ}}$, D) PHOTOFRIN, E) ZnPcS_4 AND F) ZnPcS_3C_9	145

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU I.1 STATUT ET APPLICATION DU PHOTOFRIN DANS LA TPD DANS LE MONDE.....	5
TABLEAU I.2 LES PS DE DEUXIÈME GÉNÉRATION ET LEUR APPLICATION DANS LA TPD.....	7
TABLEAU I.2 LES PS DE DEUXIÈME GÉNÉRATION ET LEUR APPLICATION DANS LA TPD (SUITE)	8
TABLEAU I.3 ESTIMATION DE LA DURÉE DE VIE DE L'ÉTAT $1\Sigma G^+$ DANS DIFFÉRENTS SOLVANTS (KRASNOVSKY, 1990; KRASNOVSKY, 2007).....	17
TABLEAU I.4 RENDEMENT QUANTIQUE DE PRODUCTION DE 1O_2 ($^1\Delta G$) PAR CERTAINS CHROMOPHORES DANS DIFFÉRENTS SOLVANTS SATURÉS D'AIR À UNE PRESSION ATMOSPHÉRIQUE (KRASNOVSKY, 2007).....	18
TABLEAU I.5 VALEURS MOYENNES DE PO_2 DANS DIFFÉRENTS TISSUS NORMAUX ET TUMORAUX...	31
TABLEAU I.6 CARACTÉRISTIQUES DES PRINCIPAUX PS POUR LA TPD À $1-\gamma$ (NOWIS ET AL., 2005; CAUCHON, 2006).....	38
TABLEAU I.6 CARACTÉRISTIQUES DES PRINCIPAUX PS POUR LA TPD À $1-\gamma$ (NOWIS ET AL., 2005; CAUCHON, 2006) (SUITE)	39
TABLE II.1 SINGLET OXYGEN CONCENTRATION AND (%) PHOTODEGRADATION OF $CuPcS_4$ AND $ZnPcS_4$ AFTER DIFFERENT IRRADIATION CONDITIONS.	64
TABLE II. 2 EFFECT OF THE $ZnPcS_4$ CONCENTRATION ON JURKAT CELL UPTAKE AFTER DIFFERENT INCUBATION TIMES.	65
TABLE IV.1 SINGLET OXYGEN PRODUCTION BY $CuPcS_4$ AND $ZnPcS_4$ AFTER DIFFERENT IRRADIATION PROTOCOLS	103
TABLE V.1 Φ_F VALUES OF PHOTOFRIN AND MPC IN DIFFERENT SOLVENTS AND GRAD VALUES USED FOR THE CALCULATIONS	121
TABLE V.2 TWO-PHOTON ABSORPTION CROSS SECTION OF PHOTOFRIN AND MPC.....	122
TABLEAU VI.1 LA σ_2 D'ABSORPTION À $2-\gamma$ POUR LE RH6G DANS LE MÉTHANOL MESURÉ À ~ 800 NM	143
TABLEAU VI.2 LA σ_2 D'ABSORPTION À $2-\gamma$ POUR DIFFÉRENTS PS (KAROTKI ET AL., 2006)	146

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AlPcS _{2adj}	Aluminium phthalocyanine adjacently disulfonated
AMD	Age macular degeneration
ATMPn	Pophycene
BPD-MA	Bnezoporphyrin derivative monoacid ring A
(BrPh) ₈ TAP	Octakis(4-bromophenyl)-tetraazaporphine
Bu ₄ TAP	2,7,12,17-Tetra- <i>tert</i> -butyl-tetraazaporphine
CW	Continuous wave
CCl ₄	Carbon tetrachloride
CIS	Intersystem crossing
CI	Internal conversion
DHE	Di-hematoporphyrin ether
DPA	9,10-diphenylanthracene
DAP	9,10-diphenylanthracene endoperoxide
DME	Dimethyl ester
DMF	Dimethylformamide
DMLA	Dégénérescence maculaire liée à l'âge
DTNB	Dithiobisnitrobenzoic acid
EBT	Exclusion du Bleu Trypan
EOR	Espèces oxygénées réactives
FDA	Food and Drug Administration
FDF	Fluorescence à deux photons
HDL	High density lipoprotein
HMT	4'-hydroxymethyl-4,5',8-trimethylpsoralen
Hp	Hématoporphyrine
HpD	Hématoporphyrine dérivative
H ₂ TPP	5,10,15,20-Tetraphenyl-21H,23H-porphine
H ₂ TBP	Tetrabenzoporphine
i.v.	Intraveineuse
Laser	Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation
LDL	Low density lipoprotein

Lu-tex	Lutetium-texaphyrin
MPc	Métallo phtalocyanine
MTT	3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium bromide
mTHPC	Tetra (metahydroxyphenyl) chlorin
Nd:Yag	Neodymium-doped yttrium aluminium garnet
NIR	Near infrared
NLT	Non linear transmission
(NO ₂ Ph) ₈ TAP	Octakis(4-nitrophenyl)-tetraazaporphine
NPe6	Mono-N-Aspartyl chlorin e6
PBS	Phosphate buffer saline
Pc	Phthalocyanine
PDT	Photodynamic therapy
PPIX	Protoporphyrine IX
Ps	Photosensitizer
RB	Rose Bengal
RBC	Red blood cells
ROS	Reactive oxygen species
Sens	Sensitizer
SnET ₂	Tin ethyletiopurpurin
SO ₃ ⁻	Groupements sulfonnés
TBE	Trypan Blue Exclusion
TPD	Thérapie photodynamique
TPIF	Two photon induced fluorescence
TPP	Tetraphenylporphyrin;
TPPS	Tetra(p-sulfophenyl)porphyrin.
TNB	Thiobisnitrobenzoic acid
ZnOEP	2,3,7,8,12,13,17,18-Octaethyl-21H,23H-porphine Zinc(II)
ZnMPTBP	Zn-5-Monophenyl-tetrabenzoporphyrin
ZnDiPTBP	Zn-5,15-Diphenyl-tetrabenzoporphyrin
ZnTriPTBP	Zn-5,10,15-Triphenyl-tetrabenzoporphyrin
ZnTPTBP	Zn-5,10,15,20-Tetraphenyl-tetrabenzoporphyrin

ZnPc	Zinc phthalocyanine
ZnPcS ₂	Zinc phthalocyanine disulfonate
ZnPcS ₄	Zinc phthalocyanine tetrasulfonate
ZnPcS ₃ C ₉	Nonynyl-ZnPcS ₃
³ O ₂	Triplet oxygen
¹ O ₂	Singlet oxygen
2-γ	Two photon
1-γ	One photon
5-ALA	5-Aminolevulinic Acid
σ ₂	Section efficace

CHAPITRE I. INTRODUCTION

I.1. La thérapie photodynamique à un photon

I.1.1. Historique médical

I.1.1.1. Historique de la photothérapie

Les effets thérapeutiques de la lumière sont connus depuis l'Antiquité. Ainsi, les Grecs ont introduit l'héliothérapie grâce à Herodoteus, père de cette thérapie, qui utilisait les effets bénéfiques des rayons du soleil sur la santé (Daniell et Hill, 1991). Les Égyptiens, les Chinois et les Indiens utilisaient, eux aussi, la lumière combinée à des substances naturelles pour traiter des maladies de la peau (vitiligo, rachitisme, psoriasis), le cancer et même la psychose (Spikes, 1985; Epstein, 1990). En 1815, Cauvin affirma que le soleil est un agent curatif pour les écrouelles, le rachitisme, le scorbut, les rhumatismes, la paralysie, les enflures, l'hydropisie et la faiblesse musculaire (Cauvin, 1815). En 1877-1878, Downes et Blunt ont découvert les forts effets bénéfiques de cette lumière pour traiter les infections bactériennes (Downes et Blunt, 1877-1878). La photothérapie a été développée et popularisée selon un aspect plus scientifique par le médecin danois Niels Finsen. Celui-ci a développé une thérapie utilisant un arc au carbone, pour traiter les lupus vulgaris. Il s'est fait décerner le prix Nobel pour cette découverte, en 1903 (Finsen, 1901).

I.1.1.2. Historique de la photochimiothérapie

La photochimiothérapie est l'utilisation d'un sensibilisateur exogène qui absorbe des photons et réagira ensuite par un effet thérapeutique. Cette thérapie a été pratiquée par les Indiens et les Égyptiens 1400 ans avant Jésus-Christ (Fitzpatrick et Pathak, 1959). Les patients atteints de vitiligo ou de psoriasis étaient traités par exposition à la lumière après une application d'huile de bergamote sur les zones affectées. On sait aujourd'hui que cette huile renferme des psoralènes, lesquels sont des photosensibilisateurs (Ps) potentiels.

En 1834, Kalbrunner isola le bergaptène ou le 5-methoxypsoralène dans l'huile de bergamote, mais il n'a pas utilisé le sensibilisateur en question dans le même but que les civilisations anciennes (Daniell et Hill, 1991). C'est au début du 20^e siècle que le concept de

photosensibilisation de systèmes biologiques fait son apparition, lorsqu'en 1900, Raab observa la photoinactivation de paramécies par l'acridine, en présence de la lumière (Raab, 1900). Par la suite von Tappeiner, avec l'aide d'un dermatologue nommé Jesionek, a publié, des données cliniques pour traiter un cancer cutané par application topique d'éosine, suivie d'une exposition à la lumière blanche (von Tappeiner et Jesionek, 1903). En 1904, les deux chercheurs, von Tappeiner et Jodlbauer, rapportèrent que l'oxygène est nécessaire lors du processus de photosensibilisation (von Tappeiner et Jodlbauer, 1904). En 1907, ces expériences ont été rapportées dans un livre dans lequel von Tappeiner inventa le terme, «Thérapie photodynamique» (TPD) pour décrire la dépendance de ce phénomène de photosensibilisation à l'oxygène (Tappeiner et Jodlbauer, 1907).

I.1.1.3. Historique de la hématorporphyrine

L'hématoporphyrine (Hp), nommée par Hoppe-Seyler (Hoppe-Seyler, 1871), a été préparée pour la première fois par Scherer en 1841 (Krasnovsky, 2007) à partir des globules rouges du sang (RBC). La première étude des propriétés biologiques des Hp a été faite par Hausmann à Vienne en 1908 (Hausmann, 1908). Il a rapporté la destruction des paramécies et des RBC et il a observé en détail les symptômes sur des souris sensibilisées après une exposition à la lumière. Afin de prouver que les résultats de phototoxicité, mis en évidence chez la souris, peuvent s'appliquer à l'homme, Friedrich Meyer-Betz se livre, en 1913, à une expérience sur lui-même en s'injectant 200 mg d'Hp (Meyer-Betz, 1913). Tant qu'il reste non exposé au soleil, rien de spectaculaire ne se produisit, cependant, lorsqu'il s'exposa à la lumière solaire, une réaction eut lieu, entraînant une hyperpigmentation de la peau et un oedème généralisé (Figure I.1). Ces symptômes étaient le résultat d'une hypersensibilité à la lumière dont il souffrira pendant plusieurs semaines.



Figure I.1 Photosensibilisation cutanée induite chez le Dr. Meyer Betz suite à l'auto injection de 200 mg de Hp et l'exposition à la lumière du soleil

La localisation sélective des porphyrines dans les tumeurs a été observée pour la première fois par Policard, en 1924, suite à la fluorescence spontanée des tissus tumoraux de rongeurs exposés à la lumière ultra-violette (Policard, 1924). La deuxième constatation majeure a été faite par Auler et Banzer : ils ont observé pour la première fois l'action photodynamique sur des tumeurs incubées de Hp exogène (Auler et Banzer, 1942). Ainsi, ils conclurent que ce Ps a une rétention spécifique et sélective envers les tissus tumoraux, par rapport à ceux qui sont sains (Daniell et Hill, 1991). En 1948, Figge observa une rétention sélective in vivo et rapporta l'importance du Hp comme outil potentiel pour le diagnostic du cancer (Figge et al., 1948). Cependant, le risque de sa phototoxicité a fait en sorte que ce Ps n'est pas souhaitable pour le traitement des tumeurs (Rasmussen-Taxdal, 1955). Durant la même année, Schwartz a partiellement purifié la partie la plus active de ce Ps et a ainsi créé un nouveau produit qu'il a nommé hématorporphyrine dérivative (HpD) (Schwartz et al., 1955).

Malgré les études préliminaires d'Auler et de Banzer, ainsi que la large investigation des propriétés de localisation des HpD, l'application de la TPD avec les Hp sur l'homme n'a commencé qu'en 1960. Ainsi, en 1966, Lipson et ses collègues rapportèrent pour la première fois l'utilisation de la HpD pour traiter le cancer sur des patients ayant une large ulcération et un carcinome de sein récurrent (Lipson et al., 1967).

La destruction effective des cellules tumorales *in vivo* a été initiée par Diamond et ses collègues, en utilisant le Hp et une lampe fluorescente sur des cellules de gliomes implantées sous-cutanées sur des rats (Diamond et al., 1972). Deux ans après, en utilisant la source laser Argon et le colorant acridine, ils ont confirmé cet effet en traitant des tumeurs épithéliales sur des souris (Thomson et al., 1974). Dougherty et ses collègues ont été les premiers à obtenir une guérison à long terme avec l'Hp sur des souris et des rats ayant une variété de tumeurs. Celles-ci ont été irradiées avec une lampe à arc au xénon filtré (> 600 nm) (Dougherty, 1975). Ce traitement a été non toxique sur l'animal et les dommages des tissus adjacents ont été minimes.

En 1976, Kelly et al. ont rapporté la rétention des HpD par les lésions malignes et pré-malignes de la vessie, ainsi que la photodestruction d'un carcinome de la vessie par une lampe de mercure (Kelly et al., 1975). Il faut signaler que le DHE (di-hématoporphyrin ether) est la fraction essentiellement responsable des propriétés photosensibles des HpD (Dougherty et al., 1984).

En 1978, Dougherty et ses collègues réalisèrent de nombreux essais cliniques de la TPD en utilisant le HpD, et depuis, plusieurs essais ont été procédés sur différents types de cancer (Daniell et Hill, 1991). Quelques années plus tard, Dougherty et ses collègues (Dougherty et al., 1987a) ont isolé, par purification, la HpD par chromatographie d'exclusion, un sous-mélange plus connu aujourd'hui sous l'appellation de Photofrin[®] et qui fut le premier Ps approuvé en clinique (Tableau I.1) (Moan et Peng, 2003).

Tableau I.1 Statut et application du Photofrin dans la TPD dans le monde

Composé	Nom commercial	Compagnie	Longueur d'onde	Statuts (Date d'accréditation, Pays et traitement)
Porfimer sodium	Photofrin	Axcan Pharma	632 nm	<p>19 avril 1993 : approuvée pour la première fois mondialement au Canada, Branche canadienne pour la protection de la santé, pour le cancer papillaire superficiel récurrent de la vessie.</p> <p>11 avril 1994 : La Hollande a approuvé le produit pour le traitement du cancer superficiel du poumon, et de façon palliative pour le cancer avancé du poumon et de l'oesophage.</p> <p>5 octobre 1994 : Le Japon, le cancer inopérable de l'oesophage superficiel et gastrique, le cancer précoce du poumon et du col de l'utérus, dysplasie du col de l'utérus.</p> <p>13 juillet 1995 : Canada, de façon palliative pour le cancer avancé de l'oesophage.</p> <p>27 décembre 1995 : États-Unis, de façon palliative pour le cancer avancé de l'oesophage, pour les patients pour lesquels la thérapie par Nd:Yag n'est pas souhaitable.</p> <p>9 avril 1996 : France, cancer récurrent du poumon et de l'oesophage</p> <p>30 juillet 1997 : Allemagne, cancer précoce du poumon</p> <p>9 janvier 1998 : États-Unis, FDA, cancer précoce du poumon</p> <p>22 décembre 1998 : États-Unis, FDA, cancer tardif du poumon</p> <p>22 décembre 1998 : Grande-Bretagne, cancer avancé du poumon et de l'oesophage</p> <p>15 février 1999 : Finlande, cancer avancé du poumon et de l'oesophage</p> <p>Autres approbations sont en cours pour : le cancer précoce de l'oesophage, oesophage de Barrett, cancer de la tête et du cou, cancer superficiel de la vessie, procédure de thérapie adjuvant pour le cancer du cerveau, cancer intra thoracique (pleural mésothélium) et les tumeurs intra péritonéal.</p>

1.1.1.4. Historique des photosensibilisateurs de deuxième et troisième génération

La structure de base de la plupart des Ps est constituée de noyaux tétrapyrroliques. Une modification des pyrroles par réduction des doubles liaisons ou la modification des substituants conduirait à la formation de nouveaux photosensibilisants dits «de deuxième génération». Ils comprennent plusieurs classes de molécules tels que les chlorines (chlorine e6, mTHPC), les purpurines (SnET2), l'acide 5-aminolévulinique (5-ALA), les phtalocyanines (Pc), les benzoporphyrines (BPD), les texaphyrines (Luténium texaphyrin) (Oleinick et al., 1998). La plupart d'entre eux dérivent de la classe des tétrapyrroles de type porphyrine; des composés formés d'un noyau aromatique avec un large système conjugué d'électrons π .

Les molécules de Pc sont d'origine synthétique, mais il est possible d'obtenir des photosensibilisants à partir de substances naturelles, notamment les phéophorbides et les bactériochlorines. Le Tableau I.2 regroupe le statut et l'application des principaux Ps de deuxième génération pour la TPD (Moan et Peng, 2003).

L'acide aminolévulinique (ALA) est un acide aminé présent à l'état naturel. C'est un précurseur de la protoporphyrine IX (PPIX). Après administration, l'ALA est transformé par des systèmes enzymatiques en porphyrine endogène (PPIX), qui joue principalement le rôle de photosensibilisant (Ackermann et al., 1998).

Tableau I.2 Les Ps de deuxième génération et leur application dans la TPD

Ps	Nom commercial	Compagnie	Longueur d'onde	Statuts et applications
Bnezo porphyrin derivative monoacid ring A, BPD-MA	Visudyne Verteporfin	QLT Inc. & Novartis Ophthalmic	690 nm	Utilisation systémique Approuvée mondialement depuis décembre 1999 : pour le traitement de la dégénérescence maculaire humide, myopie pathologique ou l'histioplasmose oculaire (Visudyne) Phase III : carcinome cellulaire basal multiple (Verteporfine)
Tetra (metahydroxyphenyl) chlorin (mTHPC)	Foscan	Biolitec	652 nm	Utilisation systémique Phase III : cancer de la tête et du cou Phase II : poitrine, gastro-intestinal, pancréas Phase I/II : thérapie adjuvant pour le cancer tardif.
5-Aminolevulinic acid (ALA)	Levulan	DUSA Pharmaceuticals, Inc.	632 nm 375-400 nm	Utilisation topique Approuvée par les États-Unis FDA (septembre, 2000), Kératose actinique Phase I/II enlèvement de poils Phase I/II : acné Instillation intra vésicale Phase I/II photo détection du cancer de la vessie
Methyl aminolevulinate	Metvix	PhotoCure ASA	632 nm	Utilisation topique Approuvée par l'Union européenne (novembre 2001), Australie et Nouvelle-Zélande : Kératose actinique et le carcinome de cellule basal
Hexyl aminolevulinate	Hexvix	PhotoCure ASA	375-400 nm	Instillation intra vésicale Phase III : détection du cancer de la vessie
Tetra (meta-hydroxyphenyl) chlorin (mTHPC)	Foscan	Biolitec AG	652 nm	Utilisation systémique Approuvée par l'Union européenne (fin 2001) : cancer du cou et de la tête. Phase II : poitrine, gastro-intestinal, pancréas Phase I/II : Thérapie adjuvant pour cancer tardif

Tableau I.2 Les Ps de deuxième génération et leur application dans la TPD (suite)

Tin ethyletiopurpurin (SnET ₂)	Purlytin	Miravant Medical Technologies	660 nm	Utilisation systémique Phase III : dégénérescence maculaire Phase II/III : cancer cutané, SIDA lié au sarcome de Kaposi Phase I : cancer de la prostate
Lutetium-texaphyrin (Lu-tex)	Lutrin Antrin Optrin	Pharmacyclics Inc.	732 nm	Utilisation systémique Phase II : cancer du sein récurrent local (LUTRINTM) Phase I : photo angioplastie de la maladie de l'artère périphérique (ANTRINTM)
Boronated porphyrin	BOPP	Pacific pharmaceuticals Inc.	628 nm	Utilisation systémique Phase I : cancer du cerveau
Mono-N-Aspartyl chlorin e6 (NPe6)	Talaporfin	Meiji Seika Kaisha Ltd. & Light Sciences Corporation	664 nm	Utilisation systémique Phase III : cancer du poumon précoce Phase II : Plusieurs types de tumeurs solides dans la tête et le cou, les poumons, le rectum et la prostate, etc.
Hypericin	VIMRxyn	VIMRX Pharmaceuticals Inc.	600-1000 nm	Utilisation systémique Phase I/II : glioblastome Phase I : agent antiviral pour les malades infectés par le HIV Utilisation topique Phase I : Lymphome cutané T-cell, sarcome de Kaposi, verrue et psoriasis
Sulphonated aluminium phtalocyanine (AlPcS)	Photosense	State Research Centre (Russia)	675 nm	Utilisation systémique Phase III : types variables de tumeurs solides dans la peau, seins, poumons, GI, etc.
Pophycene (ATMPn)	Glaxo-Wellcome Inc.		630 nm	Utilisation topique Phase I/II : psoriasis
Dibromorhodamine derivative	TH9402	Theratechnologies	515 nm	Phase I : moelle osseuse purge

Les photosensibilisants de troisième génération ont été élaborés dans le but d'induire une spécificité biologique particulière. Ce sont des dérivés de molécules de deuxième génération liées ou introduites dans des structures chimiques (acides aminés, protéines, polymères, anticorps...) afin de délivrer les Ps vers des cellules de type défini (Moser, 1997). Ainsi, une augmentation de l'incorporation des photosensibilisants dans les cellules tumorales est obtenue. Cependant, cette augmentation ne tend jamais vers une incorporation spécifique tumorale. Un exemple est l'augmentation de l'incorporation de la Chlorine e6 lorsque celle-ci est couplée à des microsphères de latex. Ici, ce sont les activités de phagocytose cellulaire qui sont mises à profit (Bachor et al., 1991a; Bachor et al., 1991b).

I.1.2. Définition générale

La TPD est un traitement radial prometteur qui combine trois paramètres : le Ps ou agent photosensibilisant, l'oxygène moléculaire et la lumière de longueur d'onde appropriée, dans le but de détruire des cellules pathologiques (cancéreuses malignes ou bénignes). Pour une procédure typique, le Ps, drogue sensible à la lumière, est administré entre autres par voie intraveineuse (i.v.) ou est appliqué localement pour un traitement cutané. Dépendamment des propriétés physicochimiques des Ps, ces derniers pourraient se lier, une fois dans le sang, soit à des lipoprotéines de faible densité (LDL) (Sharman et al., 2004) pour les Ps hydrophobes, soit à des lipoprotéines de forte densité (HDL) et aux albumines pour les Ps hydrophiles (Sheyhedin et al., 1998; Mori et al., 2000; Kessel et al., 1992). Il faut signaler aussi que le délai entre l'application du Ps et l'irradiation varie entre 15 min à 96 h, selon le tissu cible et la façon dont le produit est appliqué (Nowis et al., 2005a; Chen et al., 2006). Après localisation du Ps dans le tissu cible, la production de différentes espèces réactives oxygénées (ERO) pourrait, suite à l'administration de la lumière, causer des mortalités cellulaires et des dommages vasculaires (Dougherty, 1987b; Dougherty et al., 1998; Sharman et al., 1999). La TPD pourrait aussi activer le système immunitaire qui, à son tour, affecterait les cellules tumorales (Dolmans et al., 2003).

La TPD est utilisée pour traiter beaucoup de type de cancer (Tableau I.1,2) ainsi que d'autres maladies non malignes comme la forme humide de la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) (van den Bergh, 2001). La TPD est aussi appliquée à d'autres formes de cancer,

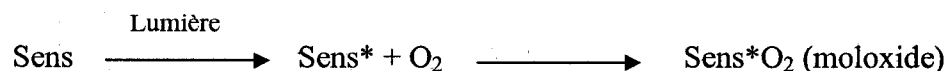
comme la métastase cutanée du carcinome du sein (Khan et al., 1993), ainsi que combiné à la chirurgie pour le cancer du cerveau (Muller et Wilson, 2006).

Elle est aussi appliquée couramment dans les méthodes de stérilisation du sang (Ben-Hur et al., 1996; Ben-Hur et Horowitz, 1995) et pour enlever les virus comme le HIV (Ben-Hur et al., 1997; Margolis-Nunno et al., 1996) et l'hépatite (Lustigman et Ben-Hur, 1996) lors d'une transfusion sanguine. Aussi, récemment, la possibilité d'utiliser la TPD, combinée avec d'autres techniques, pour la désinfection des eaux potables a été étudiée et les résultats montrent que l'eau traitée est de bonne qualité et qu'elle ne contient ni bactérie ni produit chimique (Kuznetsova, et al., 2007).

La TPD des tissus néo-plastiques, en utilisant les HpD et la lumière rouge, est présentement appliquée de façon extensive en clinique (Dougherty, 1987). En comparaison à la radiothérapie et la chimiothérapie, cette thérapie s'avère une procédure fort prometteuse en terme de sélectivité et de la faible toxicité systémique (van Lier, 1990). De plus, la TPD peut être appliquée à des tumeurs récurrentes qui ont reçu des doses maximales par la radiothérapie. À ce jour, aucun Ps ne peut être idéal pour chacune des applications possibles, mais on peut toujours tirer des propriétés optimales de chaque sujet et développer des molécules plus puissantes.

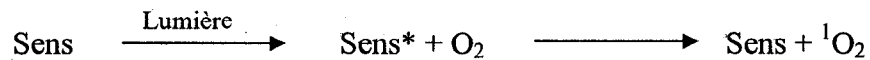
I.1.3. Mécanisme d'action

Les travaux de Bach et Engler sur la peroxydation des composés organiques ont été utilisés pour expliquer les mécanismes primaires de l'action photodynamique (Krasnovsky, 2007). En 1904, Straub proposa que l'oxygénation des substrats biologiques soit faite par des peroxydes instables, nommé plus tard « moloxide ». Ce composé est formé après illumination des colorants (Sens) (Krasnovsky, 2007) suivant l'équation :



Cette idée a été bien formulée par Schönberg, en 1935, qui a invoqué que sens^*O_2 est probablement un complexe labile, dont le rôle consiste à transférer l'oxygène aux substrats. Plus

tard, Schenk a appelé ce mécanisme «réaction de transfert d'oxygène» (Krasnovsky, 2007). En 1931, Kautsky proposa que la forme singulet de l'oxygène, suite au transfert d'énergie du sensibilisateur excité, puisse initier des réactions photodynamiques (Kautsky et de Bruin, 1931). En 1964, Foote et Wexler invoquèrent que le «moloxide», déjà discuté par Kautsky, n'était en fait que l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2$) (Foote et Wexler, 1964a,b) qui est produit suivant l'équation :



Une description plus physique du phénomène d'excitation peut être donnée (Figure I.2). La molécule du Ps absorbe d'abord un photon ($1-\gamma$) (quanta d'énergie du champ électromagnétique). Suite à cette absorption, la molécule change de configuration électronique, passant d'un état "fondamental" à un "état excité". Généralement, la molécule ainsi excitée conserve son spin électronique total, ce qui ne lui confère qu'un temps de vie très court ($\sim 10^{-12}$ s). Cependant, dans certains cas, la molécule à l'état excité peut modifier son état de spin électronique pour être portée dans un état, toujours excité, mais possédant un temps de vie beaucoup plus long (pouvant aller jusqu'à la microseconde). On dit alors qu'il y a un croisement inter système (CIS), c'est-à-dire que la molécule passe, par exemple, d'un état excité singulet à un état excité triplet. Pour que cela soit possible, un de ces électrons doit passer d'un état de spin *up* vers un état de spin *down*, ou l'inverse. Cette transition nécessite une interaction magnétique qui proviendra de l'environnement, c'est-à-dire de la molécule elle-même ou des molécules voisines. Le temps mis par la molécule pour revenir à l'état fondamental singulet s'en verra prolongé, puisqu'une interaction magnétique sera à nouveau nécessaire. Une molécule dans un état excité est très réactive. Comme elle mettra un certain temps à relaxer à l'état fondamental par un nouveau CIS, une réaction impliquant d'autres molécules de son environnement devient plus probable, puisque dans une telle situation, seule la diffusion de la molécule s'impose comme limite. C'est en leur cédant son énergie d'excitation qu'elle enclenchera l'effet photodynamique. La durée de vie plus longue de l'état de triplet permet l'interaction de l'agent photosensible excité avec les molécules environnantes et, il est généralement admis, que la génération de l'espèce toxique produite pendant la TPD se fait pendant cet état. Notons que l'énergie, absorbée sous irradiation par le sensibilisateur, ne sert pas seulement à la production de $^1\text{O}_2$, mais peut aussi être dissipée sous forme de chaleur par conversion interne (CI).

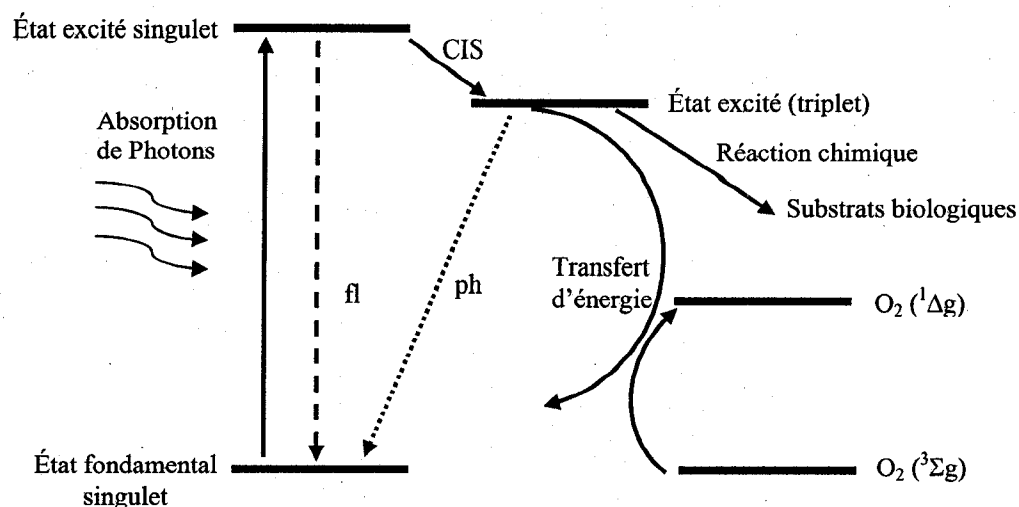


Figure I.2 Mécanisme d'excitation du Ps par des photons en continu, fl = fluorescence, ph = phosphorescence, CIS = conversion inter système. (De Rosa et Crutchley, 2002; Sherman et al., 2000; Castano et al., 2004)

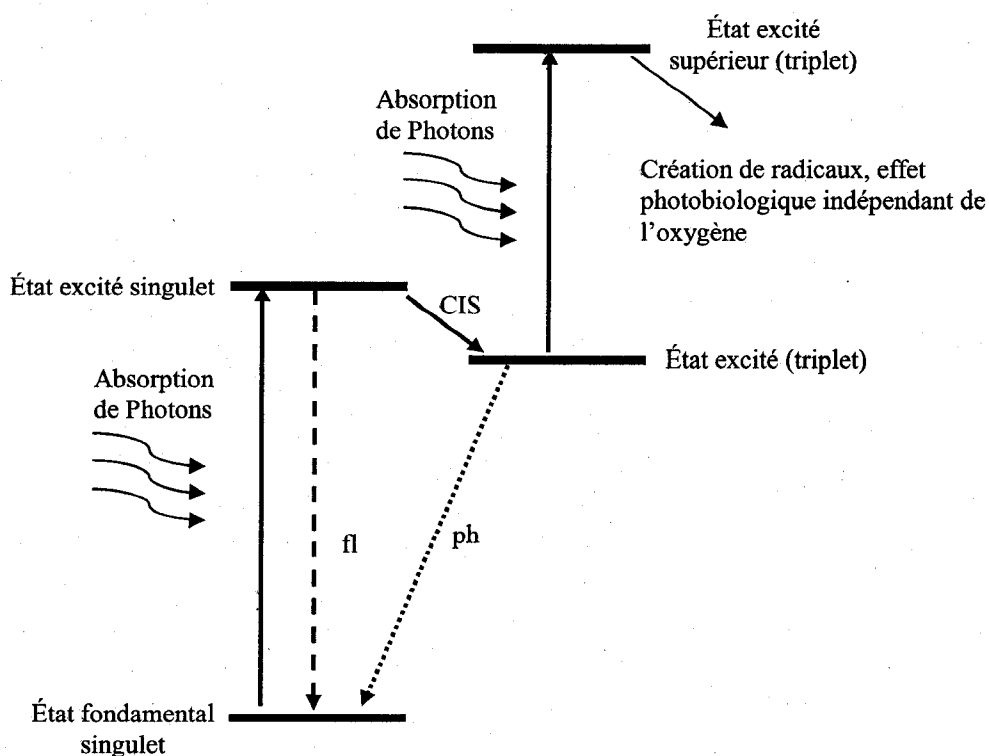


Figure I.3 Mécanisme d'action photodynamique de type III (Laustriat, 1986; Stiel et al, 1994)

L'état de triplet excité peut réagir de deux façons définies comme étant les mécanismes de type I et de type II (Foote, 1991).

Un autre mécanisme de type III (Laustriat, 1986; Stiel et al, 1994) peut avoir lieu suite à une excitation biphotonique séquentielle (Figure I.3) (voir chapitre II).

Un mécanisme de type I implique (Figure I.4) l'enlèvement d'un atome d'hydrogène ou une réaction de transfert d'électron entre l'état excité du Ps et un substrat qui peut être un composé biologique, un solvant ou un autre agent photosensible, et la libération de radicaux libres et d'ions radicalaires. Les radicaux libres sont généralement très réactifs et peuvent aisément interagir avec l'oxygène moléculaire pour produire des EOR comme des anions superoxydes ou des radicaux hydroxyles. Les radicaux libres sont aussi connus comme étant des espèces toxiques qui pourraient causer des dommages ou des lésions cellulaires irréversibles. Ce mécanisme devient plus important lorsque les concentrations d'oxygène sont basses, ou dans des environnements polaires (Ochsner, 1997).

Dans le mécanisme de type II, le Ps excité réagit directement avec l'oxygène ($^3\text{O}_2$) qui est dans un état fondamental triplet pour donner de l' $^1\text{O}_2$. Cette espèce est extrêmement réactive et peut interagir avec un grand nombre de substrats biologiques, induisant des dommages oxydatifs et finalement la mort cellulaire. Il est communément admis et accepté dans la littérature que le mécanisme de type II prédomine pendant la TPD, et que le $^1\text{O}_2$ est le principal responsable de l'effet photodynamique (Dougherty, 1987; Moan et al, 1979; Weishaupt et al, 1976; Spikes, 1975). Cependant, ces deux types de mécanismes mènent à des lésions oxydatives semblables.

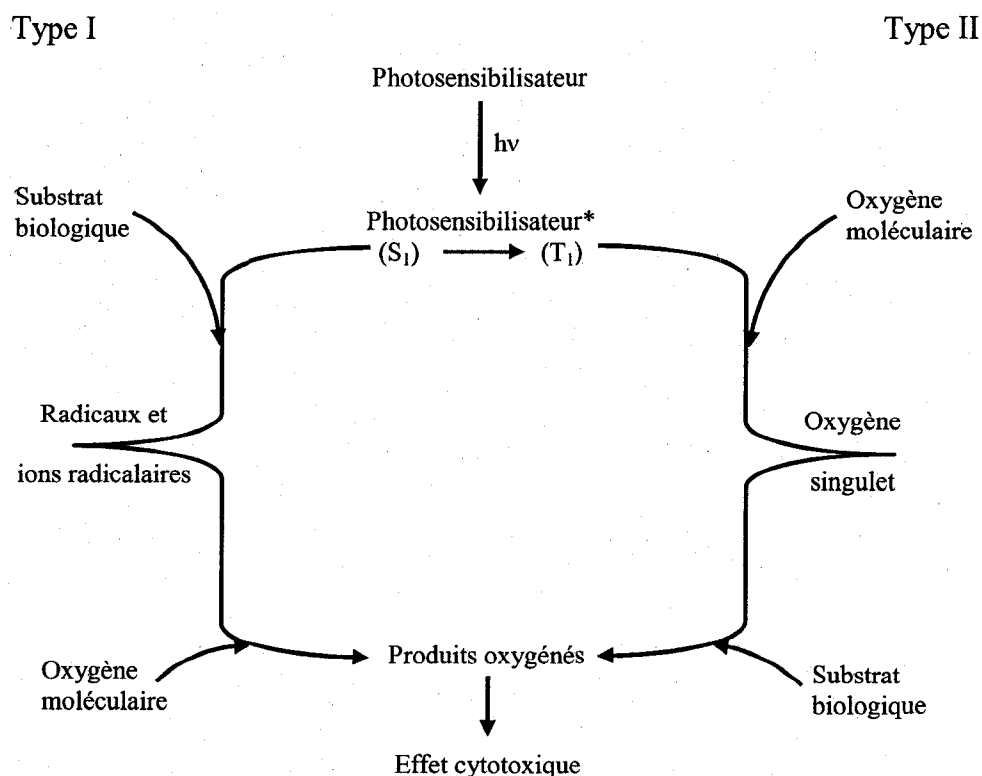
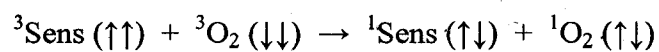
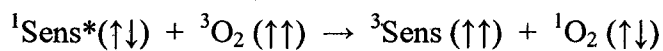


Figure I.4 Mécanisme d'action de la TPD (De Rosa et Crutchley, 2002; Sharman et al., 2000; Castano et al., 2004)

I.2. Oxygène singulet

I.2.1. Caractéristiques

Actuellement, il est généralement accepté que le concept proposé par Terenin et Ermolaev (Terenin, 1967; Ermolaev et al., 1977) dans lequel il a été expliqué que la formation de $^1\text{O}_2$ est due au transfert d'énergie entre le colorant sous forme triplet et les molécules d'oxygène qui sont des accepteurs d'énergie. Cependant, les applications des méthodes de recherches modernes ont montré la validité du mécanisme proposé par Terenin en 1943-1944 (Krasnovsky, 2007) dans lequel il a été démontré que le $^1\text{O}_2$ peut être formé par le Ps excité à l'état singulet et triplet, suivant les deux équations :



où $^1\text{Sens}$, $^1\text{Sens}^*$, et $^3\text{Sens}$ sont des molécules de Ps à l'état fondamental singulet, excité singulet et excité triplet. Le premier mécanisme est possible si l'intervalle d'énergie entre l'état singulet excité, et ce, du triplet fondamental est plus grand que l'énergie de $^1\text{O}_2$ (Figure. I.5) (Krasnovsky, 2007). Plusieurs molécules de Ps étudiées, comme les furocumarins, anthraquinones, et certains caroténoïdes, ont démontrées leur capacité à faire ce type de transfert d'énergie. Cependant, il est à noter qu'à cause de la courte durée de vie de l'état excité singulet du Ps ($\sim 10\text{-}20$ ns) ce transfert n'est possible qu'à une forte pression d'oxygène (Krasnovsky, 2007). En solution et dans les systèmes biologiques, ce mécanisme de $^1\text{O}_2$ devrait avoir une faible efficacité. Par contre, l'efficacité de la production de $^1\text{O}_2$, suivant le deuxième mécanisme, via les états triplets des Ps est reconnue comme étant la plus forte. Par exemple, en solution, le rendement de production de $^1\text{O}_2$ est proche de celle de la formation de l'état triplet du Ps à une concentration d'oxygène $\geq 10^{-5}$ M (Krasnovsky, 2007).

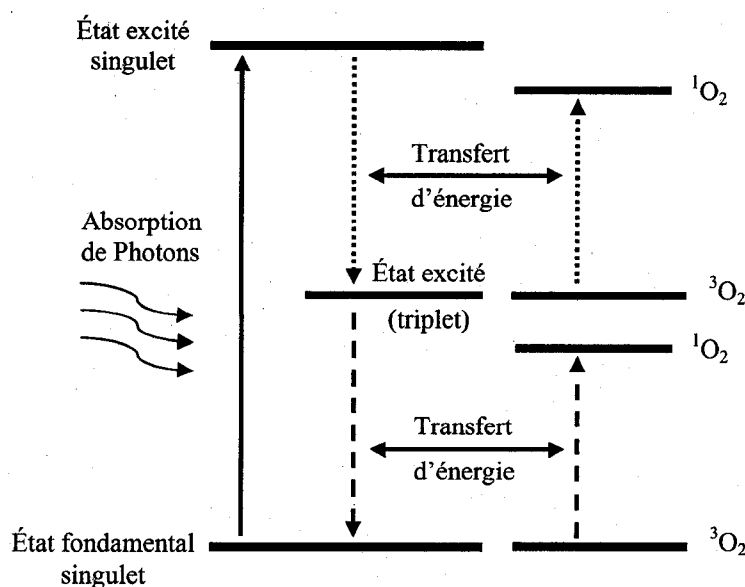


Figure I.5 Diagramme d'énergie qui présente le mécanisme de génération de l'oxygène singulet via les états excités singulet et triplet des molécules de colorant (Krasnovsky, 2007)

L'étude de la molécule d'oxygène commença en 1771, date de sa découverte, par le pharmacien suédois Carl Wilhelm Scheele. Depuis, beaucoup de recherches ont été entamées

pour comprendre l'aspect photophysique de cette molécule. Ainsi, au début du XIX siècle, Wollaston et Fraunhofer ont démontré que la transition électronique à partir de l'état fondamental de la molécule d'oxygène à un des états excités singulets correspond à la ligne rouge de Fraunhofer (762 nm) dans le spectre de radiation solaire (Wollaston, 1802; Fraunhofer, 1814-1815). Par ailleurs, en 1862, Kirchhoff démontra que cette ligne appartient aux spectres d'absorption d'oxygène dans l'atmosphère terrestre (Kirchhoff, 1862).

Au contraire des molécules couramment étudiées, l'oxygène est sous forme triplet à l'état fondamental. Ce paramagnétisme à l'état fondamental de la molécule d'oxygène a été élucidé en 1928 par Mulliken en utilisant la théorie de l'orbital moléculaire (Mulliken, 1928a,b). Il a aussi revendiqué que la molécule d'oxygène possède deux niveaux de $^1\text{O}_2$ relativement faiblement liés. Suivant la terminologie moderne, l'état fondamental de la molécule d'oxygène est nommé par le symbole spectroscopique $^3\Sigma_g^-$ alors que les plus faibles états singulets sont représentés par $^1\Sigma_g^+$ et $^1\Delta_g$ (Figure I.6). Il est à noter que, en phase gazeuse, les intensités des bandes d'absorption de l'oxygène correspondant aux transitions triplet-singulet sont très faibles à cause de l'interdiction de ces transitions par spin, symétrie et moments d'orbital angulaires (Minaev et Tikhomirov, 1984; Kasha, 1985). Aussi, Kasha a noté que la transition de la molécule d'oxygène de $^3\Sigma_g^-$ à $^1\Delta_g$ est probablement la plus interdite en nature (Kasha, 1985). Ce qui donne une métastabilité extraordinaire de cet état qui a une durée de vie plutôt longue dans les systèmes chimiques.

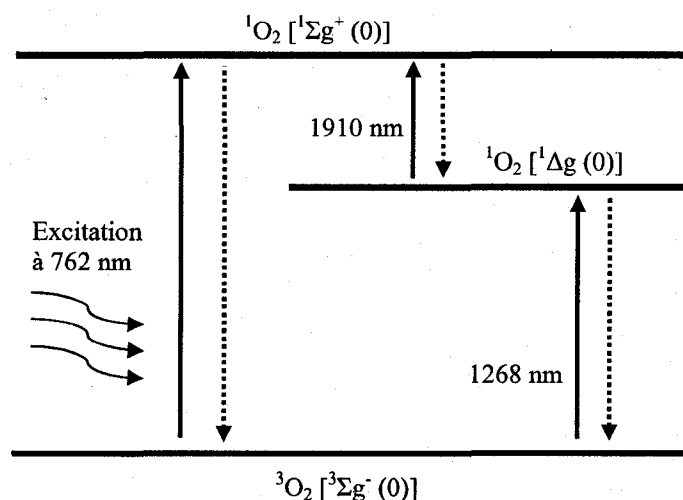


Figure I.6 Schéma des transitions électroniques entre l'état fondamental et les faibles états singulets de la molécule d'oxygène. Le nombre entre parenthèses représente les transitions vibrationnelles.

I.2.2. Méthodes de détection

I.2.2.1. Détection in vitro

L'oxygène singulet est étudié depuis plus de 75 ans. Les techniques de détection et de mesure, ainsi que la durée de vie (Tableau I.3,4) de cette espèce dépendent généralement du milieu où elle est générée. La spectroscopie optique est parmi les méthodes les plus largement utilisées qui est basée sur la désexcitation radiative de $^1\text{O}_2$ vers l'état fondamental à 1268 nm (Figure I. 6).

La luminescence de $^1\text{O}_2$ est couramment mesurée en solution (Krasnovsky, 1998), mais dans un milieu condensé, cette espèce se désactive très rapidement, ainsi sa durée de vie chute dramatiquement de ~ 3 ms à 100 ns. Ceci est causé, en fait, par sa réaction rapide avec les biomolécules avoisinantes (Moan and Berg, 1991; Schweitzer et Schmidt, 2003). Même en absence de substrats réactifs, la durée de vie de cette espèce varie de 4 μs (Lindig et al., 1980) dans l'eau à plusieurs millisecondes dans les solvants chlorocarbonés (Salokhiddinov et al., 1979). À partir de 2002, la détection de $^1\text{O}_2$ in vitro dans un milieu cellulaire et in vivo put être possible en utilisant un tube photomultiplicateur de sensibilité supérieur dans le NIR (Niedre et al., 2002). D'autres techniques indirectes ont aussi été développées en utilisant des capteurs de $^1\text{O}_2$.

Tableau I.3 Estimation de la durée de vie de l'état $1\Sigma^+$ dans différents solvants (Krasnovsky, 1990; Krasnovsky, 2007)

Solvant	τ_Σ , nsec
CCl_4	130
Chloroform	0.95
n-Pentane	0.25
n-Heptane	0.25
Ethanol	0.031
Methanol	0.017
D_2O	0.075
H_2O	0.0065

Tableau I.4 Rendement quantique de production de $^1\text{O}_2$ ($^1\Delta_g$) par certains chromophores dans différents solvants saturés d'air à une pression atmosphérique (Krasnovsky, 2007)

	CCl_4	Diethyl ether	$\text{D}_2\text{O} + 1\%$ Triton X-100
TPP/TPPS	1	1	1
Chlorophyll <i>a</i>	0.80	0.75	0.50
Pheophytin <i>a</i>	1.15	0.95	1.00
Pheophorbide <i>a</i>	1.15	1.05	0.70
Protochlorophyll	1.1	1.20	1.20
Protochlorophyllide	-	1.10	1.20
Protoporphyrin IX, DME	1.1	1.10	0.80
Mg-protoporphyrin IX, DME	-	1.10	0.80
Bacteriochlorophyll <i>a</i>	0.85	0.60	0.15
Bacteriopheophytin <i>a</i>	1.1	0.70	0.50
Bacteriochlorophyll <i>b</i>	0.95	0.70	0.20
Bacteriopheophytin <i>b</i>	1.1	0.60	0.50
Psoralen	0.008	-	0.11

L'oxygène singulet est une espèce électrophile et peut réagir avec les molécules qui sont riches en électrons. Les classes de composés qui sont reconnus comme étant capables de réagir avec le $^1\text{O}_2$ incluent les furannes, les oléfines riches en électrons, les phénols, les dialkylsulfides, les tryptophanes et les lipides (Grossweiner, 2005). Les dérivés du furanne donnent, en réagissant avec le $^1\text{O}_2$, des produits dicarbonyliques, via un intermédiaire qui est l'ozonide (Kreitner, 1996). Bien que les furannes sont fortement réactifs avec le $^1\text{O}_2$, ils peuvent aussi réagir avec d'autres oxydants, comme l'hydrogène peroxyde, et générer des produits similaires (McCall, 1984; Glaucia et al., 2006).

Le Cholestérol est aussi connu comme étant un capteur de $^1\text{O}_2$ à cause du produit formé, le 5- α -hydroperoxyde, qui est considéré comme une empreinte de l'oxydation de ce lipide dans le milieu biologique. Cependant, ce capteur a des limitations, comme la faible stabilité et réactivité du produit formé. Ainsi, le 5- α -hydroperoxyde peut se réarranger pour donner la forme 7- α -hydroperoxyde (Foote et Clennan, 1995).

La liaison réversible de $^1\text{O}_2$ avec les composés aromatiques a été exploitée pour produire des capteurs chimiques. L'endoperoxyde est considéré comme un produit spécifique de cette

réaction. Les dérivés anthracènes représentent les capteurs aromatiques de $^1\text{O}_2$ les plus utilisés et qui donnent des endoperoxydes très stables à température ambiante (température de décomposition autour de 100 °C) (Glaucia, et al., 2006). Le premier endoperoxyde aromatique polycyclique étudié est celui dérivé du rubrene. Il a été observé par Moureu et al., en 1926, suite à la perte de la couleur d'une solution du rubrene dans le benzène après exposition à la lumière solaire. Ces chercheurs ont constaté que le peroxyde formé peut régénérer le rubrene initial et l'oxygène après chauffage à 150 °C (Moureu et al., 1926).

L'avantage des dérivés anthracènes comme capteurs de $^1\text{O}_2$ se situe aussi dans leur capacité de fonctionner dans différents milieux aqueux hydrophiles et organiques hydrophobes. De plus, l'hydrophobicité de ces molécules pourrait être changée en modifiant sa structure par l'addition de substituents hydrophiliques et les positionner sur les anneaux aromatiques (Aubry, et al., 1981).

Le capteur chimique utilisé dans notre étude est le 9,10-diphenylanthracène (DPA). Ce dernier forme un produit stable qui est 9,10-diphenylanthracène endoperoxyde (Figure I.7) (Steinbeck et al., 1992; Turro, 1991).

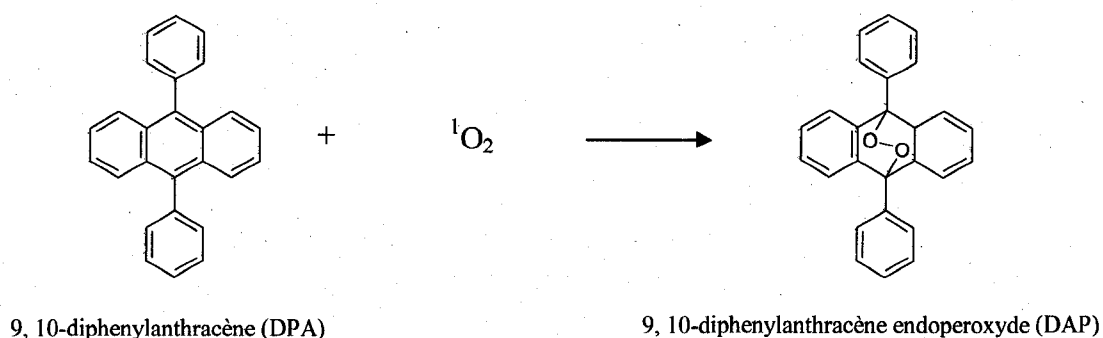


Figure I.7 Réaction du 9, 10-diphenylanthracène avec $^1\text{O}_2$

Le DPA utilisé en solution dans le DMF, possède des bandes d'absorption à 355, 375 et 395 nm (Figure I.8). Il n'y a pas de bande d'absorption dans la région d'excitation choisie dans cette étude (532 nm et 670 nm) aussi bien pour le DPA que pour le DAP. Il n'y a donc aucune possibilité d'autosensibilisation du DPA. Après oxydation, ce dernier est converti au produit stable 9,10-diphenylanthracène endoperoxyde (DAP). De ce fait, il perd son absorbance à 395 nm et cette perte est directement proportionnelle à la quantité de $^1\text{O}_2$ produite (Marengo, 1994).

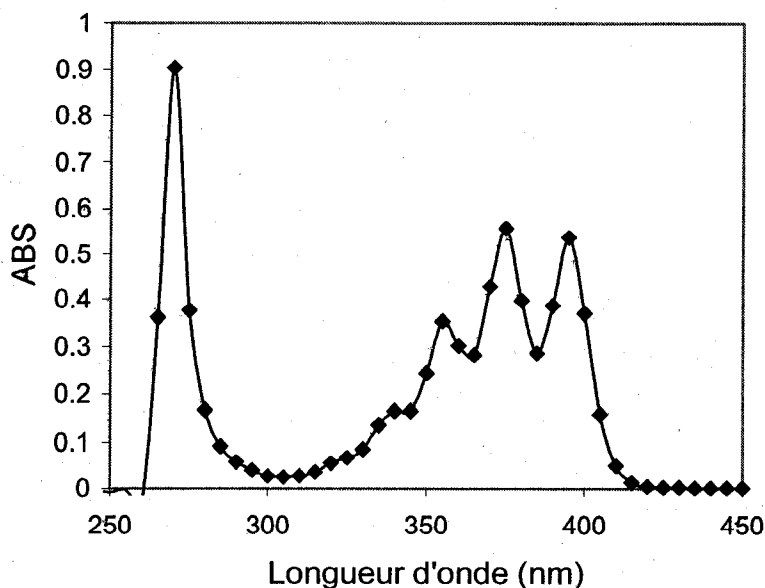


Figure I.8 Courbe d'absorbance du DPA dans le DMF à une concentration de 50 mM

I.2.2.2. Détection in vivo

La détection de $^1\text{O}_2$ in vivo est difficilement faisable à cause de la réaction de cette espèce avec les biomolécules et la non-disponibilité d'un détecteur sensible dans le NIR (1268 nm). Ceci est causé par le fait que la luminescence de cette espèce est proportionnelle à sa durée de vie. In vivo, il a été estimé par différentes méthodes que l' $^1\text{O}_2$ a une durée de vie maximale autour de 500 ns en utilisant un photodétecteur de germanium (Patterson et al., 1990). À partir de 2002, cette mesure est rendue possible en utilisant un tube photomultiplicateur. Ainsi, des mesures ont été accomplies sur la peau normale et le foie d'une souris (Niedre et al., 2002). La durée de vie de $^1\text{O}_2$ a été estimée, dans cette même étude, autour de 0.03-0.18 μs . De plus, il a été démontré par le même groupe, sur des études in vitro et in vivo, qu'il y a une corrélation entre la TPD-ALA et la luminescence de $^1\text{O}_2$ (Niedre et al., 2003; Niedre et al., 2005).

I.3. Dommages biologiques photo induits

I.3.1. Mécanismes de la TPD au niveau cellulaire

Le développement historique et la compréhension de ces mécanismes ont été revus et discutés dans beaucoup d'ouvrages (Moan, 1986; Moan et Berg, 1992). En général, ces ouvrages s'entendent sur le fait que les Ps cationiques se localisent dans le noyau et la mitochondrie. Pour les Ps lipophiles, ils restent collés sur les structures membranaires alors que ceux qui sont hydrophiles sont souvent trouvés dans les lysosomes. Cependant, le coefficient de partage lipide/eau n'est pas le seul élément d'importance, mais il y a aussi d'autres facteurs comme le poids moléculaire et la distribution des charges (symétrie/asymétrie) (Moan et Peng, 2003). Dans quelques cas, l'exposition à la lumière conduit aussi à la relocalisation des sensibilisateurs (Moan et al., 1994).

Le mécanisme de la TPD dépend clairement de la localisation intracellulaire du Ps. Ceci est causé, en fait, par la courte durée de vie et la diffusion du principal photoproduit ($^1\text{O}_2$) dans les cellules ($0.05 \mu\text{s}$, $0.02 \mu\text{m}$) (Moan et Berg, 1991). Le fait que la plupart des Ps se localisent à l'extérieur du noyau représente certainement la principale raison pour laquelle la TPD a un faible potentiel mutagénique (Moan et Peng 2003). Le rendement quantique de photoinactivation cellulaire varie d'un Ps à l'autre. Ainsi, les sensibilisateurs lipophiles tendent à avoir un grand rendement que les Ps hydrophiles (Moan et al., 1992). La TPD a un grand effet sur la division cellulaire (Berg al, 1990), ce qui est probablement dû aux dommages des microtubules (Moan et Peng, 2003). Sous certaines conditions ces dommages peuvent contribuer significativement à la mortalité cellulaire induite par TPD. La Figure I.9 récapitule le mécanisme complet de la mortalité cellulaire par la TPD.

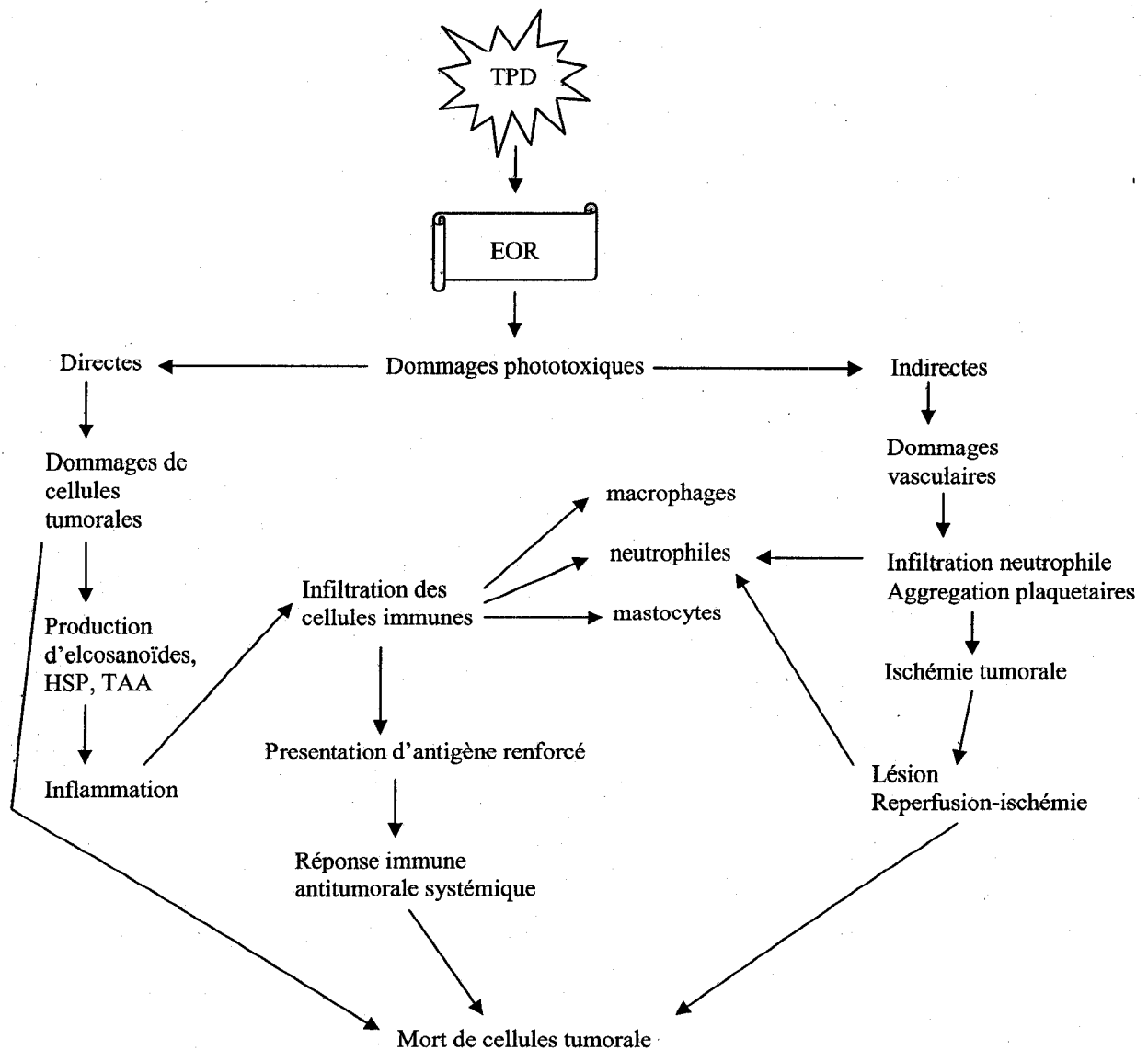


Figure I.9 Mécanisme d'effet anti tumoral induits par la TPD à 1- γ (Nowis et al., 2005a)

I.3.2. Détection de mortalité cellulaire

Beaucoup de tests biologiques exigent la mesure de survie cellulaire et /ou prolifération de cellules mammaires. Ceci peut être réalisé par une variété de méthodes, comme par exemple; le compte de cellules qui inclure ou exclure des colorants et la mesure de la libération de protéines marquées ^{51}Cr après la lyse cellulaire, ainsi que la mesure de l'incorporation de nucléotides

radioactifs ($[^3\text{H}]$ thymidine ou $[^{125}\text{I}]$ iododeoxyuridine) durant la prolifération cellulaire (Mosmann, 1983).

Dans ce projet nous avons décidé d'utiliser deux méthodes de mesure de survie cellulaire, le test MTT est l'exclusion du Bleu Trypan (EBT).

1.3.2.1. Test MTT

Le test au MTT (Mosmann, 1983) est utilisé pour évaluer le nombre de cellules viables en mesurant l'activité mitochondriale. Il permet d'avoir des informations sur la cytotoxicité des drogues ainsi que la prolifération et l'activation cellulaire. Les résultats peuvent être tirés et lus dans des plaques de culture cellulaire multi trous. Le principal avantage de ce test réside dans sa rapidité et sa précision. Il est basé sur la transformation du MTT (3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium bromide) en cristaux bleus de formazan en présence d'un enzyme mitochondrial, la succinate déshydrogénase (Figure I.10). Cette réduction prend place seulement quand l'enzyme mitochondrial réductase est actif et, par conséquent, cette conversion est directement reliée au nombre de cellules viables. Après la réaction de conversion, une solution est ajoutée pour solubiliser les cristaux formazan. Cette solution pourrait être le sulfoxyde di méthyle, éthanol acidifié ou détergent (sulfate de sodium dodécyl dilué dans l'acide hydrochlorique). L'absorption du produit final dissout est mesurée à une longueur d'onde (habituellement, entre 500 et 600 nm, dépendamment du solvant utilisé) par spectrophotométrie à balayage. Cette mesure d'absorption permet de comparer la croissance des cellules témoins à celle des cellules traitées ou irradiées.

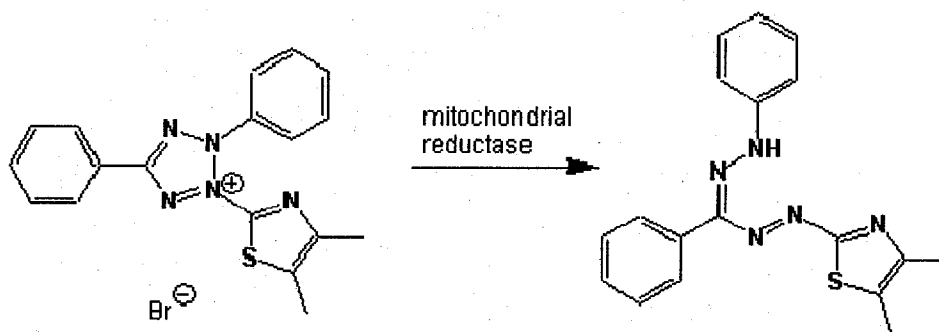


Figure I.10 Réaction de l'enzyme mitochondrial avec le MTT

I.3.2.2. Test Bleu Trypan

Le Bleu Trypan, colorant diazo, est ainsi appelé, car il peut tuer les parasites (trypanosomes) qui causent la trypanosomiase africaine, couramment appelée « maladie du sommeil ». Ce colorant est aussi appelé « bleu diamine » et « bleu Niagara ». Il a été synthétisé pour la première fois par le scientifique allemand Paul Ehrlich, en 1904. En 1908, ses travaux sur l'immunologie lui vaudront le prix Nobel de médecine, en partage avec le russe Élie Metchnikov. La Figure I.11 illustre la structure de colorant Bleu Trypan.

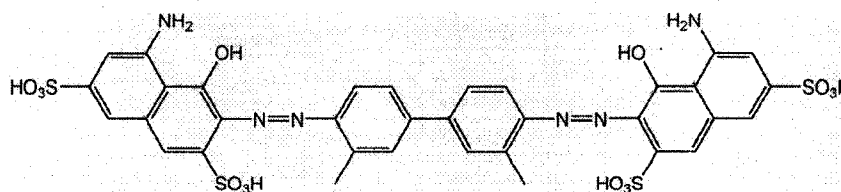


Figure I.11 Structure de la molécule de Trypan Bleu

Le colorant Trypan bleu est une molécule anionique utilisée pour déterminer le nombre de cellules vivantes présentes dans une suspension cellulaire. Le test Bleu Trypan est basé sur le principe que les cellules vivantes possèdent des membranes intactes qui excluent ce colorant alors que les cellules mortes vont être teintes en bleu. Dans ce test, la suspension cellulaire est simplement mélangée avec le colorant Bleu Trypan, puis visualisée, en utilisant un hymacytomètre, par un microscope. Les cellules vivantes auraient un cytoplasme clair et opaque alors que celles ayant une membrane défectueuse (cellules mortes) auraient un cytoplasme bleu. La survie cellulaire est calculée par l'équation suivante :

$$\text{Viabilité cellulaire (\%)} = \frac{\text{Nombre de cellules (viables)} \times 100}{\text{Nombre total de cellules (viables + nonviables)}}$$

I.3.3. Mécanisme de la TPD au niveau tissulaire

La relation entre l'efficacité de la TPD et l'oxygénation des tumeurs a été étudiée et les résultats montrent qu'il y a une dépendance directe entre le niveau d'oxygène et la mortalité cellulaire

aussi bien in vitro qu'in vivo (Moan et Sommer, 1985; Henderson et Fingar, 1987). Ainsi, sous des conditions anoxiques, aucune mortalité cellulaire n'est observée, alors que l'effet est maximal à une concentration d'oxygène autour de 5%. Cependant, la moitié de la dose létale a été observée à 1% de niveau d'oxygène.

Il a été démontré que le fractionnement des doses d'illumination constitue une méthode permettant de maintenir une bonne oxygénation de la tumeur. Ce protocole d'irradiation améliore l'efficacité de la TPD (Dougherty et al., 1979). Les périodes d'arrêt d'illumination permettent une ré-oxygénation des tissus hypoxiques et améliorent la destruction des cellules tumorales. Par contre, la réussite de cette méthode se situe surtout au niveau de la sélection du temps entre chaque période d'irradiation. Ainsi, des temps d'attente plus longs pourraient permettre aux cellules de réparer les dommages induits, d'augmenter la survie cellulaire et de résister aux traitements (Cauchon, 2006).

Kessel et ses collègues ont proposé que les Ps lipophiles et ceux liés aux liposomes ou aux lipoprotéines sensibilisent directement les cellules tumorales, alors que les Ps hydrophiles attaquent principalement le système vasculaire tumoral (Kessel et al., 1987). L'importance des dommages vasculaires a été premièrement démontrée de façon convaincante par Henderson et ses collègues (Henderson et al., 1985). Ces chercheurs ont observé une constance entre la cinétique de survie des cellules tumorales et l'anoxie. Ainsi, ils ont démontré qu'une des causes de la mortalité cellulaire après la TPD est la destruction vasculaire. Le degré de cette destruction varie avec la morphologie tumorale, ainsi qu'il y a un niveau critique de dommages vasculaires et/ou mortalités cellulaires nécessaires pour éradiquer de façon totale les tumeurs (Henderson et al., 1985).

Canti et ses collègues ont été les premiers qui ont observé et démontré l'induction des effets immunologiques dans la TPD (Canti et al., 1981). Le système immunitaire est maintenant, vu comme étant un paramètre qui joue un rôle significatif dans la destruction de la tumeur par TPD aussi bien que la prévention de la récurrence de la maladie (Korbelik, 1996).

L'apoptose est un mécanisme de mortalité cellulaire qui a été démontré pour la TPD (Agarwall et al., 1991). Ainsi, Kessel et Luo ont proposé que les dommages de la mitochondrie puissent être une étape importante dans l'apoptose induite par la TPD (Kessel et Luo, 1998).

I.3.4. Mécanisme de la TPD au niveau enzymatique

I.3.4.1. Généralité

Les études de l'effet de la TPD sur les systèmes biologiques au niveau moléculaire représentent la base de la compréhension de l'effet photodynamique de cette thérapie. Ainsi, la photo modification chimique des biomolécules par les EOR cause des dysfonctionnements qui aboutissent à la mortalité cellulaire (Prado et Santiago, 2004). Beaucoup d'études de mesure de l'efficacité des Ps ont été accomplies, par exemple, l'étude de la photomodification de la membrane cellulaire (Valenzano et Pooler, 1982; Valenzano, 1987) ou de l'inactivation des enzymes comme le Catalase (Gantchev et van Lier, 1995).

La fragmentation de l'ADN a été aussi observée comme résultat de la TPD par l'acide 5-aminolévulinique (ALA). De plus, le mécanisme de l'apoptose, après la TPD-ALA, a été confirmé par électrophorèse de l'ADN. Une augmentation de l'activité apparentée à celle de la caspase-3 a été détectée à la suite de la TPD-ALA (Gad et al. 2001). Il a été aussi démontré que le HpD inhibe significativement l'enzyme mitochondrial interne (cytochrome c oxydase) et le synthétase F_0F_1 ATP. Ces résultats ont été obtenus à partir d'un protocole expérimental, in vivo in vitro, dans lequel le Ps a été exposé aux éléments métaboliques et pharmaco cinétiques (Hilf, 2007).

La photo inactivation de l'acétylcholinestérase (ACE) des RBC par le Rose Bengal (RB) a été également largement étudiée. Le 1O_2 représente le médiateur exclusif de cette inhibition (Fluhler et al., 1989; Lambert et al., 1996).

Plusieurs études, faites sur des cellules, ont rapporté la difficulté de la distinction entre les dommages photo induits aux noyaux et ceux à la membrane plasmique (Sadowska et al., 2001). Le changement de l'activité de l'ACE pourrait servir comme un indicateur de l'état de fonctionnement et le degré de l'altération de la membrane plasmique (Halbhuber et al., 1984). Dans le cas de l'érythrocyte, par exemple, la photo inactivation de l'ACE peut être aussi directe en attaquant la molécule elle-même qu'indirecte, via la membrane. La dernière situation est associée à une altération du potentiel de la membrane (hyperpolarisation) et une diminution de sa fluidité (Sadowska et al., 2001). Ce changement de la fluidité pourrait causer une modification de la conformation de l'ACE, ancrée dans la membrane à deux couches, provoquant le changement de son activité.

L'action photodynamique cause des dommages extensifs de la membrane cellulaire. Des études faites avec le Protoporphyrine IX, ont démontré des réticulations des protéines de la membrane (Goeij et al., 1975; Goeij et al., 1976; Girotti, 1976) incluant le spectrin, la diminution de la déformabilité des RBC (Dubbelman et al., 1977), l'inhibition de plusieurs liaisons protéiniques et la photo hémolyse de l'érythrocyte.

1.3.4.2. L'enzyme acétylcholinestérase

L'acétylcholinestérase est un composé clé des synapses cholinergiques du cerveau et des jonctions neuromusculaires. En physiologie, sa présence est nécessaire pour permettre aux récepteurs cholinergiques de revenir à leur état de repos après activation. L'ACE est présent au niveau des synapses cholinergiques ou dans celles du système nerveux central où il est lié à la membrane postsynaptique, alors que dans les synapses neuromusculaires, il est lié à la lame basale qui s'étend entre membranes pré et postsynaptiques. Cette dernière caractéristique facilite son extraction. Enfin, elle est également présente dans le sérum sanguin et on peut mettre en évidence son activité en utilisant directement du sérum à la place de l'extrait enzymatique.

Le rôle biologique majeur de cet enzyme est la terminaison de la transmission de l'impulsion par l'hydrolyse rapide du neurotransmetteur cationique (acétylcholine). L'inactivation de l'acétylcholine, libérée dans la fente synaptique, permet la re-capture de la choline par la terminaison synaptique.

La description du mécanisme catalytique de l'ACE, au niveau moléculaire aussi bien que la spécification des mécanismes des schémas cinétiques, représente des éléments nécessaires pour la compréhension de l'effet de l'inhibition de cet enzyme. Ceci est largement pris en considération lors de la fabrication des pesticides, des agents thérapeutiques et des armes chimiques (Tōgu, 2001). À partir de ses fonctions catalytiques, l'inhibition de l'ACE affecte la prolifération cellulaire, la différenciation, ainsi que la réponse aux différentes insultes incluant le stress (pour plus de détail voir Venekei et al., 1996).

Le site actif de l'enzyme ACE est localisé dans une profonde gorge catalytique étroite (Sussman et al., 1991; Sussman et al., 1992). Il est évident que cette structure ne facilite pas le trafic de substrats et de produits vers et à partir du site actif. Des mécanismes pour contourner ces restrictions ont été largement discutés dans la littérature. Ainsi des méthodes de guidance électrostatiques ou aromatiques ont été proposées (Nolte et al., 1980; Tan et al., 1993; Ripoll et

al., 1993). D'autres chercheurs, pour remédier à ce problème, plaçaient des capteurs électrostatiques (Radic et al., 1998) ou encore des putatifs « back door » dans les sites actifs (Ripoll et al., 1993; Gilson et al., 1994). Cependant et paradoxalement, la structure de ces sites actifs rend l'ACE un enzyme extrêmement réactif.

Cet enzyme est considéré avoir une évolution parfaite. Ainsi, toutes les étapes de la réaction catalytique (association de substrat, transformation chimique et dissociation de produits) se font suivant une vitesse similaire. De plus, il est reconnu, que l'ACE a été amélioré de façon à rendre, principalement, la réaction d'hydrolyse plus rapide plutôt qu'augmenter la vitesse de diffusion du substrat à l'intérieur du site actif.

La structure tridimensionnelle de l'ACE montre que le site actif de la gorge contient seulement quelques ions de charges négatives qui pourraient interagir avec des substrats et des inhibiteurs cationiques.

1.3.4.3. Excitation à deux photons de l'enzyme acétylcholinestérase

Beaucoup de travaux ont été entamés pour rechercher l'effet des états excités supérieurs de la molécule du RB. Ainsi, Allen et ses collègues ont étudié la dépendance entre l'inhibition de l'ACE de la RBC, et la longueur d'onde d'excitation. Bien que la lumière visible induit la photoinactivation de l'enzyme par le Type II via l'état triplet T_1 , celle de l'UVA provoque une inhibition de cet enzyme via l'états S_n par la formation de radicaux (Allen et al., 1991). Une voie alternative, pour peupler l'état excité supérieur triplet, via une excitation séquentiel par deux photons ($2-\gamma$) de faible énergie, est possible. Il est bien établi que cette absorption séquentielle de molécules organiques, et leur excitation vers des états supérieurs, peut induire des mécanismes réactionnels différents (Scaiano et al., 1988).

L'approche d'absorption séquentielle à $2-\gamma$ (deux couleurs) a été investiguée et appliquée sur l'enzyme ACE et des cellules monocytes macrophages P388D1. Ils ont ainsi combiné deux impulsions laser; le premier (à 532 nm) servant à exciter le RB de l'état fondamental vers l'état T_1 alors que le deuxième (à 640 nm), à ré-exciter ce Ps de T_1 vers T_n . Les résultats ont montré une inhibition des deux entités biologiques indépendante de l'oxygène (Smith et al., 1994). Cependant, bien que l'excitation séquentielle du RB, avec une impulsion laser à 532 nm de forte intensité, peuple l'état excité T_n l'inactivation de l'ACE nécessite la présence de l'oxygène

(Lambert et al., 1996). Ces résultats ont été expliqués par le mécanisme de diagramme d'énergie illustré dans la Figure I.12 (Lambert et al., 1999). Ainsi, la différence de l'inhibition de l'ACE incubé de RB par les deux régimes d'excitation est due à l'état excité triplet cible. L'illumination du RB avec 2- γ pulsés (deux couleurs) excite la molécule du Ps vers l'état T_n à partir de laquelle des radicaux pourraient être produits. Alors que l'utilisation d'une source pulsée (une couleur) à forte intensité excite la molécule vers l'état T_{n+1} par lequel la molécule suit une CIS inverse vers l'état S_2 .

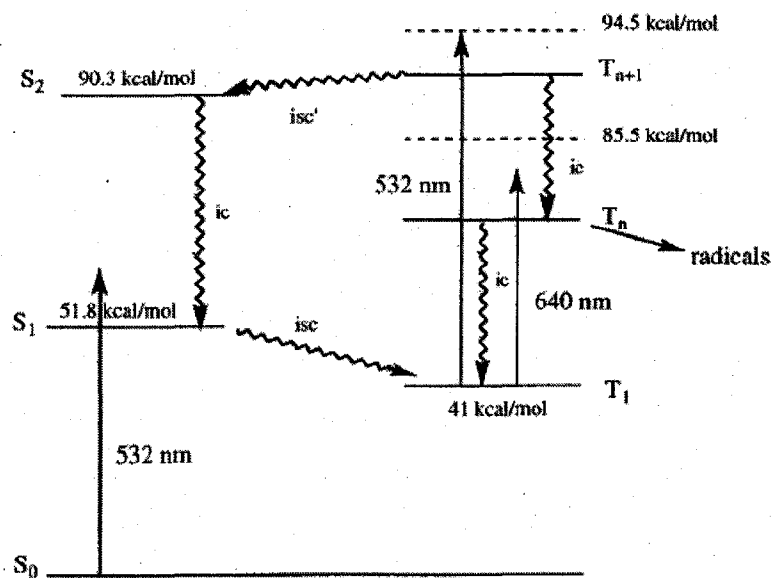


Figure I.12 Diagramme d'énergie proposé pour l'excitation de la molécule du Rose Bengal (Lambert et al., 1999)

I.4. Exposé de la problématique de la TPD à un photon

L'activité photodynamique est influencée par trois facteurs, à savoir : la lumière (spécificité, fenêtre thérapeutique), l'oxygène (pression d'oxygène intra- et intercellulaire) et le Ps (sélectivité tumorale). Une photothérapie efficace exige la présence de ces trois facteurs dans toutes les régions à traiter et une seule déficience d'un de ces paramètres empêcherait toutes activités phototoxiques et altérerait le bon fonctionnement de cette thérapie.

I.4.1. Hypoxie de la tumeur

L'oxygène est le déclencheur de la réaction photodynamique; il représente un élément clé dans le mécanisme de phototoxicité et un intermédiaire par lequel l'énergie provenant de l'état triplet excité du Ps devient toxique. L'efficacité de la photothérapie est directement proportionnelle à la pression partielle d'oxygène (pO_2). Plusieurs facteurs influencent la concentration en oxygène dans les tissus comme la vascularisation, les caractéristiques du tissu, l'hétérogénéité et le métabolisme cellulaire (Nowis et al., 2005). La pO_2 diminue en fonction de l'éloignement du réseau capillaire et augmente avec le niveau de la vascularisation. Par exemple, si la pO_2 est de 15% au niveau des alvéoles pulmonaires, elle n'est que de 4% dans le foie, de 3% au niveau de la moelle osseuse et peut diminuer jusqu'à 0.025 % au centre d'une tumeur (Ebbesen et al., 2000; Lewis et al., 1999).

Le niveau d'oxygène dans la tumeur varie en fonction de l'emplacement de celle-ci dans l'organisme par exemple l'oxygénation d'une tumeur rénale est généralement plus faible qu'une tumeur pulmonaire. L'hypoxie tissulaire, au sens strict, se définit comme une concentration en oxygène inférieure aux valeurs physiologiques et qui ne permet pas de satisfaire aux besoins de survie des tissus. Le terme « hypoxie » ou « déficience en oxygène » peut être interprété différemment par les spécialistes (Bauer, 1990).

Pour les biochimistes, l'hypoxie implique une pression partielle inférieure à 0.1 mmHg à partir de laquelle la fonction normale de la mitochondrie commence à diminuer (Honig, 1981). Pour les physiologistes, l'hypoxie correspond à la valeur de la pression d'oxygène à laquelle la fonction des organes s'est détériorée (Cotran et al., 1989). Pour les radiobiologistes, elle correspond à la pression d'oxygène à laquelle les cellules résistent aux radiations ionisantes (0-10 mmHg) (Hill, 1987). Pour les chimiothérapeutes, il pourrait être un facteur de résistance ou d'amélioration de la réponse tumorale au traitement (Tannock, 1987).

Dans les tumeurs humaines xénogreffes perfusées, une région hypoxique est équivalente à un endroit où la pO_2 est inférieure à la normale alors qu'une région anoxique est équivalente à 0 mmHg de pO_2 (Vaupel, et al., 1989). Ces deux régions sont présentes dans les premières étapes de la croissance et s'étendent avec la croissance de la tumeur (Vaupel et al., 1987; Kallinowski, 1989). Les valeurs moyennes, de pO_2 dans les tissus (cancéreux et sains), mesurées par modulation du flux sanguin et par microtechniques polarographiques et cryospectrophotométriques, sont données dans le tableau I.5 (Vaupel et al., 1989).

Bien que les valeurs de pO_2 dans les tissus normaux varient de 24 à 66 mmHg, celles pour les tissus tumoraux analysés sont inférieures de 20 mmHg (Vaupel, et al., 1989). La distribution de la pression d'oxygène pour les tumeurs transplantées a été décrite en détail (Vaupel, et al., 1981; Vaupel, 1977; Vaupel, 1979). En général, comme un résultat de l'anisotropie de la microcirculation sanguine est compromis, la plupart des tumeurs malignes ont des aires hypoxiques et anoxiques distribuées de façon hétérogène à l'intérieur de la masse tumorale.

Tableau I.5 Valeurs moyennes de pO_2 dans différents tissus normaux et tumoraux

Tissu	pO_2 moyenne (mmHg)
Rate	66 ^a
Tissu subcutané	50
Mucose gastrique	47
Col utérus	36
Muscles squelettiques	28
Myocarde	25
Foie	24
Cerveau	24
Cancer du col de l'utérus	
stage 0	20
stage I	13
stage II	5
Adenocarcinomes	10-12
Carcinome spinocellulaire	15
Cancer du sein	17

^a pO_2 de l'artère = 100 mmHg (1%=7.6 mmHg)

Dans la majorité des tumeurs solides, les cellules bien vascularisées sont généralement viables et bien oxygénées (Cauchon, 2006). Alors que la croissance cellulaire accélérée fait en sorte que la vascularisation insuffisante et mal organisée perturbe la microcirculation. Ceci cause,

à l'aide de l'épaisseur du tissu tumoral, une réduction du taux de diffusion de l'oxygène engendrant une diminution de la concentration de l'oxygène de la périphérie vers le centre de la tumeur et autour des zones métaboliquement actives (Figure I.13) (Belcourt et al., 2005). Cette situation hostile n'empêche pas la prolifération, mais entraîne une distribution non homogène des nutriments et de l'oxygène. Les cellules tumorales sont très hétérogènes en terme de prolifération ou de consommation de l'oxygène. Les tumeurs solides contiennent des régions hypoxiques qui constituent fréquemment 5-30% de la population totale de cellules viables (Shyam et al., 1999).

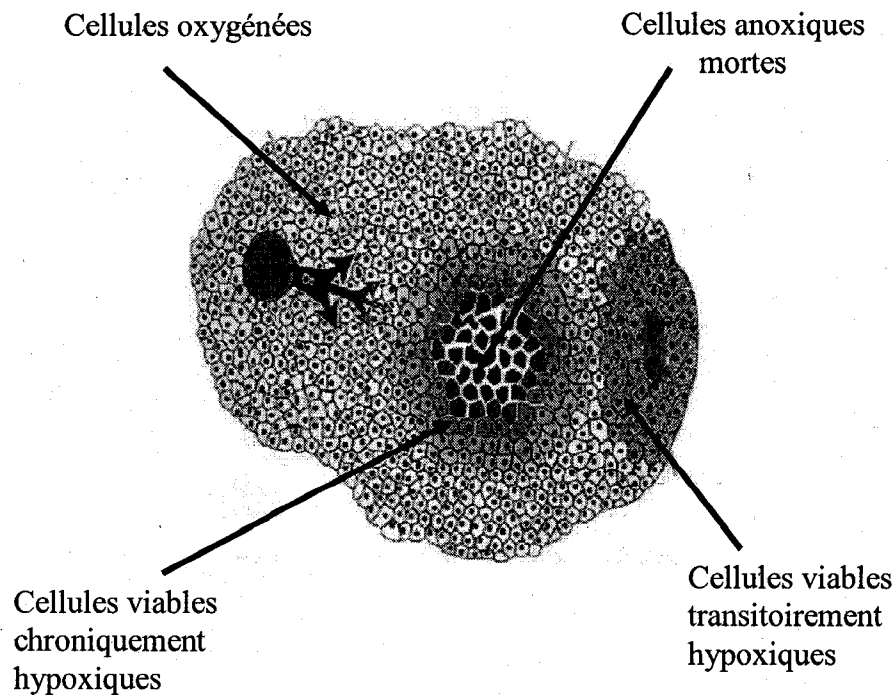


Figure I.13 Schéma d'une tumeur solide

La présence de microzones hypoxiques ou anoxiques peut être répartie dans toute la tumeur, mais la zone nécrotique apparaît après un éloignement de $>70\ \mu\text{m}$ des vaisseaux nourriciers (Vaupel et Mayer, 2005). Dans une zone hypoxique, les cellules subsistent dans un environnement hostile et leur survie dépend de leur capacité d'adaptation. Généralement, ces cellules réduisent leur croissance jusqu'à la dormance provoquant une réduction de l'accumulation des drogues, une augmentation du temps disponible pour procéder aux réparations, une formation réduite de radicaux due à l'absence d'oxygène, etc. Ces cellules

restent viables et peuvent reprendre en tout temps leur vitesse normale de croissance permettant la progression de la tumeur vers un phénotype plus résistant, plus agressif, ainsi que des métastases.

La dépendance entre l'effet de la TPD et l'oxygène a été étudiée pour la première fois in vitro sur des cellules cancéreuses par Moan et Sommer (Moan et Sommer, 1985). Ils ont trouvé que l'efficacité de la photoinactivation cellulaire dépend fortement de la concentration d'oxygène.

Durant la photosensibilisation, in vivo, la fluctuation de la concentration en oxygène représente un paramètre crucial qui limite l'efficacité de la thérapie. Comme l'illumination est incapable de générer des EOR capables de provoquer des mortalités cellulaires, la photothérapie est ainsi inefficace dans ces régions. L'oxygénation des tissus est un des facteurs qui définit le microenvironnement cellulaire qui est considéré comme le modulateur de la sensibilité des cellules cancéreuses à certaines modalités de traitement non chirurgical (Vaupel et al., 1989).

Tout d'abord, le procédé consomme ou altère une quantité importante d'oxygène lors de la formation des produits oxygénés. Ceci dépend en général des taux de photons délivrés et de triplets formés durant le processus d'illumination. Par exemple, un taux de consommation, non négligeable, variant entre 6 et 9 $\mu\text{M}/\text{sec}$ a été rapporté en utilisant le Photofrin et une source lumineuse de 50 mW/cm^2 (Fuchs et Thiele, 1998). Généralement la vitesse de consommation dépasse le taux de réalimentations limitant ainsi la disponibilité de l'oxygène et générant de plus en plus des conditions hypoxiques.

En second lieu, la détérioration des vaisseaux durant l'illumination cause une réduction de l'oxygénation et conduit à l'hypoxie. Un effet cumulatif des deux phénomènes génère finalement une nécrose des tissus illuminés. Durant cette dernière étape, l'alimentation en oxygène est interrompue par la constriction des vaisseaux et l'arrêt de la circulation sanguine. Le niveau d'oxygène est irréversiblement réduit, provoquant des zones anoxiques et des dégâts irréversibles. Ces zones sont réputées pour protéger les cellules dormantes responsables de la recroissance tumorale après traitement. Les cellules dans les régions hypoxiques sont fréquemment responsables de la récurrence de la maladie.

I.4.2. Sélectivité des photosensibilisateurs

Les Ps sont des composés chimiques capables d'absorber l'énergie de la lumière à une longueur d'onde spécifique et de la transférer à d'autres molécules pour produire des agents toxiques. Une centaine de composés naturels et synthétiques peuvent jouer le rôle d'agents photosensibilisants. Actuellement, au Canada, le Photofrin est le seul composé accrédité qui est utilisé en clinique pour des traitements divers. La pharmacocinétique des dérivés des porphyrines, leur distribution tissulaire et leur mécanisme d'action ont été étudiés principalement chez la souris, notamment par Dougherty et ses collaborateurs (Henderson et Dougherty, 1992; Bellnier, et al., 1989).

Vingt-quatre-heures après l'administration intraveineuse, 1% seulement de l'agent photosensibilisant injecté demeure dans la circulation. L'ordre décroissant des tissus normaux qui retient le DHE est le suivant : foie, surrénal, vessie > pancréas, rein, rate > estomac, os, poumon, coeur > peau > muscle >> cerveau (Henderson et Dougherty, 1992; Bellnier et al., 1989; Bugelski et al., 1981). Les dérivés porphyriques ont donc une affinité particulière pour les tissus riches en composantes réticuloendothéliales. Enfin, il faut signaler que le DHE n'est pas métabolisé et ne disparaît que très lentement de ces tissus. À titre d'exemple, 30% de la quantité accumulée dans les poumons est toujours présente 75 jours après l'administration. Cette observation implique que l'accumulation de l'HpD et de la DHE (comme des autres agents photosensibles) ne se fait pas exclusivement dans la tumeur, un phénomène important en particulier pour ce qui concerne les effets tardifs de la photothérapie et surtout la photosensibilisation cutanée. Le temps de demi-vie sérique est de 20 à 30 heures, mais la rétention du composé au niveau cutané dépasse six semaines (Pass, 1991). Des inconvénients majeurs sont reliés à l'utilisation des HpD dont l'accumulation des Ps qui rend la peau et les yeux sensibles à la lumière (Vrouenraets et al., 2003; Capella et Capella, 2003). Par exemple, le HpD et quelques dérivés de porphyrines restent dans la peau d'une durée aussi longue que quatre semaines après le traitement (Hayata et Konaka, 1990). Ainsi, les patients sont conseillés d'éviter l'exposition à la lumière au moins six semaines après la TPD (Freeman et al., 1998). Dans la mesure où la distribution de l'agent photosensible est large, le caractère sélectif du traitement tumoral repose probablement sur les différences de la concentration de celui-ci entre la tumeur et le tissu normal environnant (Gomer et Dougherty, 1979; Kaye et al., 1985; Kessel, 1986a).

La raison de l'accumulation préférentielle de l'agent photosensible dans les cellules tumorales fait toujours l'objet de controverses. Parmi les facteurs incriminés figurent notamment

l'angiogenèse de la tumeur, son faible degré de drainage lymphatique ou une liaison avec des lipoprotéines (Henderson et Dougherty, 1992; Kessel, 1986b). La distribution de l'agent photosensible à l'intérieur de la tumeur elle-même (par exemple sa répartition entre le stroma et le parenchyme tumoral) demeure, elle, mal connue. Au niveau cellulaire, les études in vitro démontrent une localisation préférentielle membranaire (membrane plasmique, mitochondriale, nucléaire et réticulum endoplasmique) des agents anioniques lipophiles que sont les dérivés des porphyrines (Moan et al., 1989).

I.4.3. Fenêtre thérapeutique et spécificité de la lumière utilisée

Parmi les limitations les plus saillantes est le faible coefficient d'extinction des porphyrines, utilisées présentement en clinique, dans la fenêtre thérapeutique du corps humain (650-800 nm, région de faible absorptivité dans les tissus mammaires typiques) (Atilgan et al., 2006). La quantité de la lumière qui pourrait pénétrer dans les tissus varie énormément à cause des propriétés optiques du milieu biologique. Elle est influencée, aussi, par plusieurs autres facteurs, dont la longueur d'onde de la lumière utilisée, le type et la pigmentation du tissu, la dimension et la localisation de la tumeur, ainsi que les caractéristiques d'absorption du Ps (Nowis et al., 2005).

La lumière visible est spécialement sensible au contenu sanguin des tissus. Ainsi, elle pourrait être diffusée ou absorbée par les chromophores naturels (mélanine, hémoglobine) (Figure I.14). Ainsi, sous 600 nm, la forte capture des photons émis par l'hémoglobine limite fortement la pénétration de la lumière dans le tissu, tandis qu'une lumière ayant une longueur d'onde supérieure à 900 nm ne produit pas d'énergie suffisante pour permettre la production de $^1\text{O}_2$ (Castano et al., 2004).

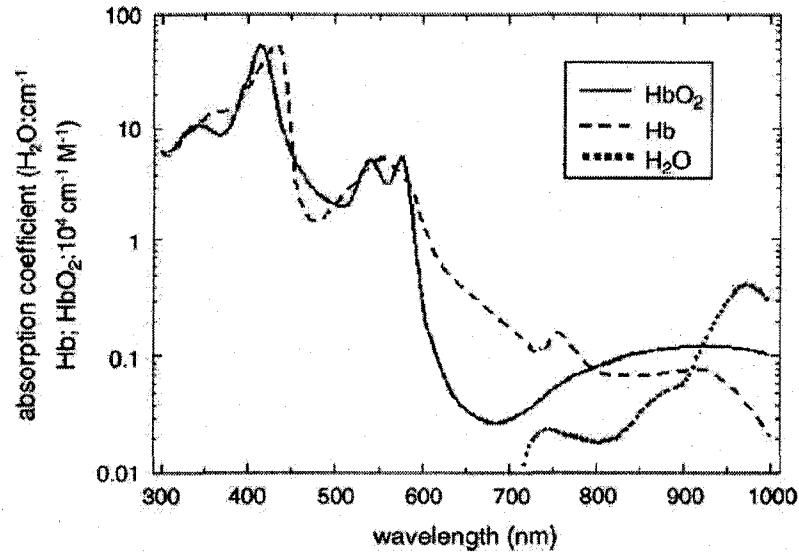


Figure I.14 Courbe d'absorption de l'hémoglobine oxygénée (HbO₂) et non oxygénée (Hb) et de l'eau (Licha et Olbrich, 2005)

La profondeur de pénétration de la lumière dépend également de sa longueur d'onde : une lumière de 800 nm pénètre 5 mm de plus que celle de 630 nm (Nowis et al., 2005; Castano et al., 2004; Allison et al., 2004). L'utilisation d'un Ps ayant une absorption maximale autour de 800 nm permet de traiter des tumeurs plus grosses ou plus profondes. Une éradication d'une tumeur de plus 1 cm est possible, mais exige un apport important du système immunitaire (Moan et Peng, 2003).

Par ailleurs, la lumière doit être délivrée de manière à fournir une énergie suffisante et à recouvrir entièrement la région traitée tout en minimisant les dommages aux tissus sains avoisinants.

La dosimétrie dépend de chaque Ps et doit tenir compte des pertes encourues par la présence de molécules biologiques photosensibles, la réduction propre aux propriétés physiques des tissus, la concentration de Ps accumulée ainsi que son coefficient d'extinction (Castano et al., 2004; Henderson et Dougherty, 1992).

Les tissus cancéreux sont fortement enflammés et, par conséquent, ils ont un fort contenu sanguin qui limite la pénétration de la lumière (Jacques et al., 2002). De plus, le développement d'une tumeur implique une augmentation du niveau de couches cellulaires autour des vaisseaux

nourriciers. Cette croissance sous forme d'étages provoque un éloignement progressif des cellules périphériques de ces vaisseaux et une réduction importante de leur degré d'alimentation. Ainsi, la pénétration de la lumière est atténuée par l'épaisseur du tissu tumoral donc les cellules plus centrales pourraient ne pas recevoir une intensité lumineuse suffisante pour permettre une photosensibilisation efficace.

La pénétration de la lumière dans les tissus vivants dépend fortement de sa longueur d'onde. Ainsi l'utilisation d'une source laser infrarouge, moins énergétique que celle UV visible, réduit le photoblanchiment des colorants et le photodommage des tissus biologiques. De plus, la source laser infrarouge permet une pénétration plus profonde dans les tissus biologiques.

La lumière perd une quantité importante de son intensité durant son trajet par diffusion ou par absorption dans les différentes cellules du tissu (Wilson et Patterson, 2008). L'intensité lumineuse diminue exponentiellement, avec la distance. Donc, plus le tissu est épais ou profond, plus la lumière sera atténuée. Chaque tissu est caractérisé par un facteur d'atténuation et le niveau de pénétration du flux lumineux diminue progressivement avec l'augmentation du coefficient d'atténuation.

L'absorption et la dispersion optique diffèrent d'un tissu à l'autre. La pénétration dans le foie, par exemple, est fortement réduite par la teneur élevée en hémoglobine, tandis que la structure réfractaire de la calotte crânienne empêche l'exposition des tissus du cerveau (Henderson et Dougherty, 1992).

Tableau I.6 Caractéristiques des principaux Ps pour la TPD à 1- γ (Nowis et al., 2005; Cauchon, 2006)

Ps	L. O. (nm)	Coefficient d'extinc- tion (M^{-1} cm^{-1})	Mode de délivr- ance	Véhicule de délivrance	Dose topique (mg kg^{-1})	Dose de lumière (Jcm^{-2})	Temps après injection	Photosensi- bilité de la peau	Commentaires
HpD	630	3.0×10^3	i.v. ou crème	Dextrose 5%	2.0-5.0	100-200	24-48 h	2-3 mois	Approuvé en clinique pour le traitement de plusieurs types de cancer
5-ALA	635	$<5.0 \times 10^3$	Crème, orale ou IV	Soluble (eau)	< 60 oraleme nt < 30 (i.v.)	100-200	-	1-2 jours	Précurseur converti dans la mitochondrie en protoporphyrine IX
BPD-MA	690	3.5×10^4	i.v.	Liposo- male	0.1-2.0	100-200	30-150 min	3-5 jours	Concentration tumorale suffisante après 30 min, clairance rapide, faible photosensitivité de la peau et approuvé pour le traitement de la dégénérescence maculaire
SnET ₂	660	2.8×10^4	i.v.	Émulsion lipidique	1.0-2.0	100-200	24 h	Jusqu'à 1 mois	Photosensitivité cutanée importante
Temop- orfin	652	3.0×10^4	i.v.	PEG/ éthanol/ eau	0.1-0.3	8-12	24-48 h	Jusqu'à 6 semaines	Phototoxicité élevée exigeant de très faibles doses de drogue et de lumière
Texap- hyrins	732	4.2×10^4	i.v.	Soluble (eau)	0.6-7.2	150	3-5 h	minimale	Stabilité augmentée, pénétration très profonde des tissus, stages cliniques avancés en cardiologie, aucune photosensitivité de la peau
Pc	670-680	2.5×10^5	i.v.	Liposo- male ou soluble (eau)	0.5-2.0	100	24-72 h	8-10 jours	Bonne stabilité, pénétration très profonde des tissus, stage clinique avancé en cardiologie

Tableau I.6 Caractéristiques des principaux Ps pour la TPD à 1- γ (Nowis et al., 2005; Cauchon, 2006) (suite)

Ps	L. O. (nm)	Coefficient d'extinction (M ⁻¹ cm ⁻¹)	Mode de délivrance	Véhicule de délivrance	Dose topique (mg kg ⁻¹)	Dose de lumière (Jcm ⁻²)	Temps après injection	Photosensi- bilité de la peau	Commentaires
NaPc	750- 780	>10 ⁵	i.v.	Liposomale	-	-	-		
N-aspartyl chlorin e6	664	4.0×10 ⁴	i.v.	Soluble (eau)	0.5-3.5	25-100	4 h	3-7 jours	Accumulation rapide dans les tumeurs
ATMPn	630	5.2×10 ⁴	Crème	Liposomale	1.0-3.0		-	n/a	-
Hypericin	595	4.4×10 ⁴	Crème	Liposomale	-	-	24 h	-	Faible pénétration de la lumière Utilisé principalement pour le traitement du psoriasis et des cancers superficiels de la peau

I.5. Les phtalocyanines

Ces Ps, dits de secondes générations, sont considérés très prometteurs en raison de leurs propriétés chimiques améliorées et ils apparaissent comme une alternative aux porphyrines.

Les Pc présentent une absorption maximale aux alentours de 670 nm, près de la fenêtre thérapeutique (de 700 à 1100 nm, environ). Une étude menée par Ben-Hur et Rosenthal (Ben-Hur et Rosenthal, 1986) démontre que la lumière utilisée pour l'excitation des Pc (670 nm) procure une longueur de pénétration de 20% plus grande dans la peau et de 50% plus grande dans le cerveau que celle utilisée pour exciter le HpD (630 nm).

Les Pc furent les premiers Ps introduits après les porphyrines et constituent des composés très attirants en raison de leurs propriétés photophysiques et photochimiques avantageuses. De plus, l'addition des groupements sulfonates à la périphérie du Pc augmente considérablement la solubilité de ces composés et leur succès comme agent de la TPD. Plusieurs efforts ont été consacrés afin d'élucider les mécanismes d'action de ce Ps ainsi que les réponses tumorales induites (van Lier, 1990).

I.5.1. Définition et propriétés

Les Pc imitent les porphyrines dans leur macrocycle central et ils constituent d'unité de tétrapyrrole cyclique (Figure I.15). Les Pc sont des dérivés d'azoporphyrines dont le macrocycle est composé de quatre groupes pyrroles fusionnés par des liens d'azotes et étendus de quatre anneaux de benzènes au niveau des sous unités pyrroles. Ceci leur confère une forte bande d'absorption dans le rouge qui correspond aux régions de la fenêtre thérapeutique.

Ces modifications structurales provoquent un déplacement de l'absorption à des longueurs d'onde plus éloignées dans la région rouge du spectre d'absorption. Ce spectre, en fait, est constitué de deux bandes d'absorption; une bande Q (600-700 nm) et une Soret (300-400 nm). La deuxième bande est ~ deux fois plus petite que la première en terme de coefficient d'extinction molaire. Ce changement d'absorption permet une capacité de pénétration améliorée et un coefficient d'extinction molaire supérieur ($\epsilon \approx 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Tableau I.6), ce qui augmente leur efficacité thérapeutique par rapport aux porphyrines (630 nm, $\epsilon \approx 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Par ailleurs, les Pc sont non toxiques, stables, faciles à synthétiser ou à modifier ce qui constitue un avantage en terme de propriétés photophysiques et pharmacologiques. De plus,

l'utilisation des Pc réduit significativement la photosensibilité de la peau des animaux traités (van Lier, 1990a; Allen et al., 2001; Sharman et al., 1999).

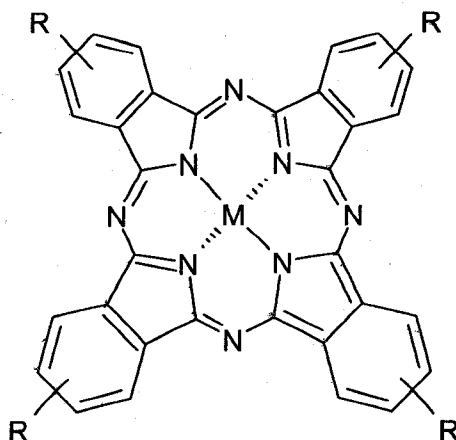
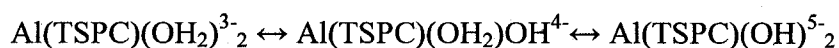


Figure I.15 Structure typique des Pc où M est un ion métallique central (Al, Co, Cu, Fe, Ga, Ni, Si ou Zn) et R représente une multitude de substituants périphériques dont SO₃H, F, COOH, etc.

L'absorption maximale des Pc solubles dans l'eau peut varier faiblement avec le pH. Ces variations sont attribuées aux changements des ligands axiaux coordonnés au métal central plutôt que les sites des macrocycles (Ferraudi, 1988). Par exemple, dans le cas de AlCl-PcS, le déplacement dans la bande Soret et la bande Q (10 nm) est observé en fonction du pH de manière à ce que qu'il y ait une existence de deux équilibres acido-basiques causées par des déprotonations de l'eau coordonnée axialement (Ferraudi, 1988).



I.5.2. Rôle du métal central

Les Pc forment des complexes d'ions métalliques stables préparés directement par chélation des cations métalliques avec quatre pyrroles azotés centraux (Jackson, 1978). L'ion métallique central peut-être représenté par Al, Co, Cu, Fe, Ga, Si, Ni ou Zn et chacun d'entre eux affecte

différemment la stabilité, les rendements et les propriétés de transfert d'énergie du triplet ainsi que l'agrégation de la molécule du Pc. Une photosensibilisation efficace exige un triplet possédant une demi-vie d'au moins une microseconde. L'incorporation d'un ion diamagnétique «coquilles fermées» (Al, Ga, Si ou Zn) dans le centre du macrocycle peut donner des triplets d'une demi-vie ($\tau_T \geq 0.4$ ms) et une énergie variant entre 110 et 125 kJ/mole, laquelle est suffisante pour générer 1O_2 (94.5 kJ/mole) (Allen et al., 2001).

La complexation des phtalocyanines avec des métaux paramagnétiques, «coquilles ouvertes» (Cu, Co et Fe), fait en sorte que les molécules de Ps produisent des triplets de courte demi-vie ($\tau_T < 20$ ns) et affichent une phototoxicité minimale (van Lier, 1990a).

I.5.3. Structure chimique

Les Pc sont généralement des composés hydrophobes et insolubles dans la plupart des solutions aqueuses. Une augmentation de la stabilité des Pc faciliterait leur utilisation dans les systèmes biologiques. La structure chimique des phtalocyanines se modifie facilement par l'ajout d'un ou de plusieurs substituant à partir des valences excédentaires du métal central ou des benzènes périphériques. Par contre, l'emploi du zinc comme ion métallique limite les modifications structurales aux éléments périphériques du macrocycle parce qu'il est dépourvu de valence supplémentaire comme le Ga, Al et Si.

L'obtention d'un dérivé soluble du Zn ou CuPc peut être réalisée par sulfonation soit par condensation de l'acide sulfophthalique ou par réaction directe avec l'acide sulfurique fumant. Le produit final est ordinairement un mélange de mono- di- et tri- et tétrasulfoné que l'on peut facilement séparer par chromatographie en phase liquide inversée. La méthode directe donne des dérivés plus actifs. Les études précédentes de notre équipe portant sur les phtalocyanines sulfonées hydrosolubles ont démontré leur efficacité pour la destruction des cellules tumorales in vitro et la régression des tumeurs in vivo. Les propriétés hydrophobes et hydrophiles dépendent du degré de sulfonation et affectent différemment le niveau d'agrégation, la capacité de produire de 1O_2 et l'activité photodynamique résultante (Wagner et al., 1987).

Nous avons précédemment synthétisé des PcS de zinc, de gallium et d'aluminium avec divers degrés de sulfonation par des méthodes de condensation ou de sulfonation (Ali et al., 1988). Ces études précédentes ont établi une relation inverse entre la solubilité et l'activité en fonction du nombre de groupements sulfonés (SO_3^-). Plus le nombre de SO_3^- croît plus la

solubilité augmente, par contre, la phototoxicité devient négligeable. Ces études ont aussi démontré que la présence de deux groupements SO_3^- adjacents (ZnPcS_2) produit une activité photodynamique maximale, mais la présence d'un grand nombre d'isomères (~16) complique grandement la purification d'une seule forme isomérique.

I.5.4. Propriétés biologiques et activité photodynamique

L'efficacité photodynamique des Pc substitués, en addition à leurs propriétés photophysiques, dépend de leur mode de distribution et leur stabilité in vivo. De plus, le mécanisme des dommages in vivo, via le type I ou II, dépend largement de la disponibilité de l'oxygène moléculaire et de l'association intermoléculaire des colorants avec les constituants cellulaires vitaux de tissus cibles (van Lier, 1990). Le mode de distribution, la spécificité de l'organe, et les interactions moléculaires sont fortement influencés par la nature des substitués des Pc et la lipophilicité des colorants. Les Pc non substitués lipophiliques (Ben-Hur et Rosenthal, 1985; Brasseur et al., 1985) et leurs dérivés sulfonés (Brasseur et al., 1988) ont démontré des bonnes propriétés photodynamiques. La phototoxicité relative varie de façon substantielle entre les différents dérivés phtalocyanines, bien que la relation entre activité et structure a été étudiée largement (van Lier, 1990).

I.6. La TPD à deux photons

I.6.1. Définition

Pour contourner les inconvénients cités ci-dessus, la méthode proposée est l'excitation des molécules de Ps vers un état excité supérieur via une activation à 2- γ . Une molécule dans un tel état pourrait réagir selon la chimie des états excités supérieurs, plus riche, et peut-être indépendante de l'oxygène. Cette méthode fait appel à l'optique linéaire en utilisant des sources laser continus et non linéaires avec des sources laser courts (en nanoseconde) et ultracourts (en femtoseconde).

En général, il y a deux types de régimes d'excitation qui induisent des absorptions multiphotoniques (Figure I.16) (Wilson et Patterson, 2008).

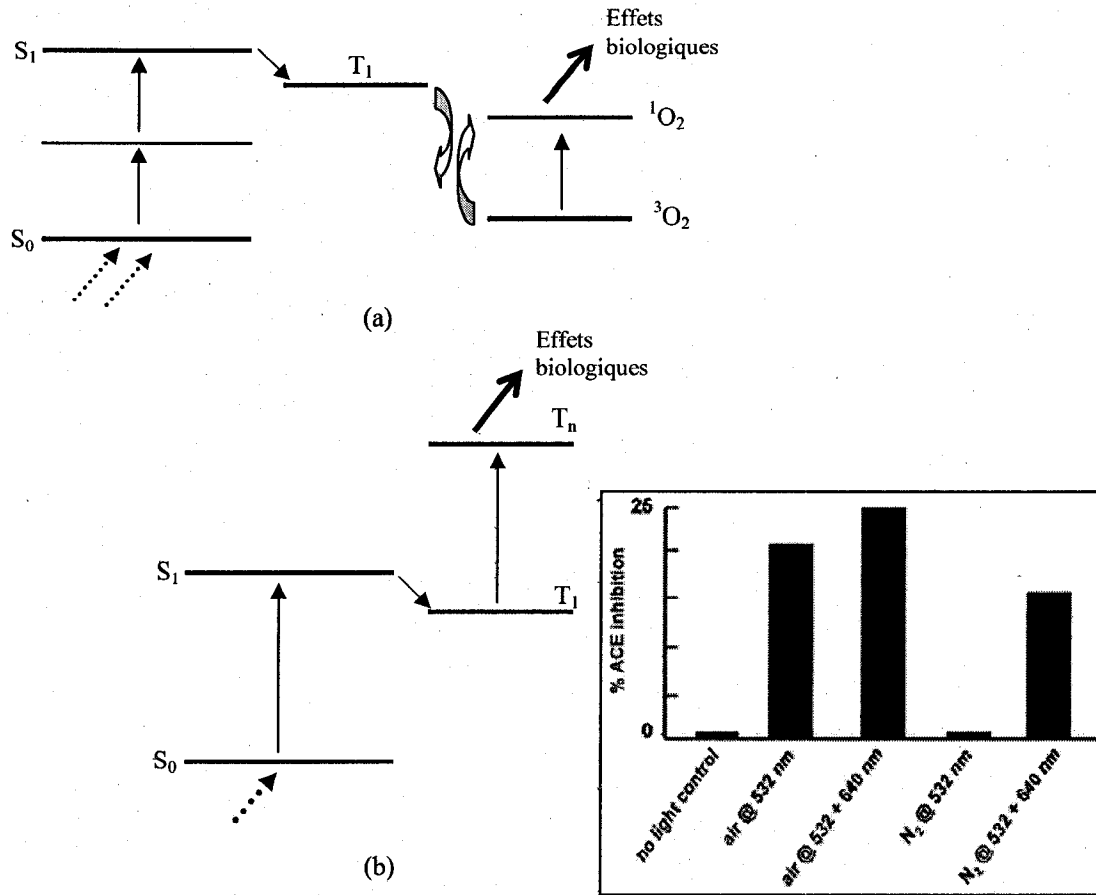


Figure I.16 Mécanismes des deux différentes formes de la TPD à 2- γ

I.6.2. Excitation à deux couleurs

I.6.2.1. Généralité

La première forme de l'activation à 2- γ (Figure I.16 (b)) fait appel à deux sources laser de longueurs d'onde différentes. Le premier active le Ps vers un état excité singulet (S_1) puis par CIS le Ps passe à un état triplet (T_1). Alors que la deuxième source laser, après un court intervalle de temps, ré-excite le Ps à un état triplet supérieur. À partir de ces états hautement énergétiques, des espèces toxiques pourraient être produites et interagir avec des biomolécules.

Ainsi, tel qu'illustré dans la figure I.16 (b), le point saillant de cette technique est qu'on peut causer des mortalités cellulaires dans un milieu hypoxique, ce qui est particulièrement avantageux à la TPD des tumeurs solides. Les défis techniques pour réaliser cliniquement ce

traitement demandent que (a) le Ps ait un fort coefficient d'extinction molaire à l'état fondamental et triplet à des longueurs d'onde raisonnable du point de vue de la fenêtre thérapeutique; (b) la durée temporelle, durant l'irradiation, entre les deux impulsions laser devrait respecter l'étude photophysique du Ps.

Récemment, il a été démontré qu'à partir d'un état excité triplet supérieur de la molécule de Ps, un effet photodynamique peut-être enclenché sans l'apport d'oxygène par la génération de produits phototoxiques différents (Smith et al, 1994; Stiel et al, 1994). Pour porter la molécule dans un état triplet supérieur en n'utilisant qu'un seul photon, nous aurions besoin de la lumière UV, bien en-dehors de la fenêtre thérapeutique. L'irradiation avec la lumière UV cause des dommages biologiques sévères tout en pénétrant faiblement à travers le tissu. Avec des impulsions laser centrées qui émettent dans la région NIR, le peuplement des états excités supérieurs est possible suite à une excitation séquentielle. À partir des états excités singulets supérieurs, des espèces réactives toxiques additionnelles peuvent être créées comme des radicaux (Paul et al., 2002). Par exemple, Andreoni et ses collègues ont démontré que l'excitation du HpD par une impulsion laser (337.1 nm, 10 ns) induit des effets cytotoxiques additionnels que celle d'une source laser continu (CW) (336.6 nm) (Andreoni, 1982). Aussi il a été démontré que cette augmentation pourrait être causée par la formation de radicaux qui sont indépendants de l'oxygène (Andreoni, 1987). Une preuve additionnelle vient du travail de Fluhler et ses collègues qui ont observé une forte inactivation de l'ACE dans les RBC, incubées de RB, après excitation à 2- γ (Fluhler et al., 1989). En se basant sur ces résultats, Leupold et Freyer ont proposé un mécanisme de photosensibilisation alternatif pour la TPD des tumeurs (Leupold et Freyer, 1992).

Cependant, dans les ouvrages, il n'existe qu'une communication apparue en 1994 dans laquelle les auteurs démontrent la faisabilité de ce mécanisme à 2- γ in vitro sur l'enzyme ACE et sur des cellules macrophages monocytes (P388D1) (Smith et al, 1994) (voir l'histogramme dans la Figure I.16 (b)). Dans cet ouvrage, Smith et ses collègues ont démontré une inactivation enzymatique (15%) et cellulaire (8%) incubée de RB, dans un milieu hypoxique, suite à une excitation par deux impulsions laser centrées (532 et 640 nm). Ils ont ainsi conclu que l'espèce toxique créée via l'état excité triplet (T_n) est le radical RB^{*+} identifié par son absorption à 470 nm (Lambert et al., 1990).

I.6.2.2. Étude photophysique

Il existe deux voies de peuplement de l'état triplet supérieur, à partir duquel la nouvelle action photodynamique devrait s'enclencher (voir Chapitre II). Récemment, une étude photophysique (dynamique ultrarapide de relaxation) détaillée de la molécule du phtalocyanine tétrasulfonées contenant un ion métallique central paramagnétique Cu^{++} (CuPcS_4) a été effectuée dans notre laboratoire (Fournier et al., 2003). Des études du même genre ont déjà été menées sur d'autres molécules (Home et Zhang, 1998; Pelliccioli et al, 2001; Zhong et al, 1996; Home et Zhang, 1997; Rückmann et al, 1997). Cette connaissance permet de déterminer les paramètres optimaux de l'excitation biphotonique. La molécule de CuPcS_4 a été choisie, surtout pour son faible rendement en $^1\text{O}_2$, dû essentiellement à leur court temps de vie triplet (Rosenthal et al, 1986). De cette manière, il sera possible de mener une étude complète à temps court et, lors de l'éventuelle étude du mécanisme lui-même, les mécanismes de types I et II n'interviendront pas sur le résultat final.

Pour réaliser une étude à la fois qualitative et quantitative de la dynamique de relaxation de la molécule de CuPcS_4 , un modèle plus complexe développé par Gouterman et ses collègues, (Ake et Gouterman, 1969; Schaffer et al, 1973; Gouterman et al, 1970) a été utilisé. Ces modèles ont été jumelés à des données provenant de mesures d'absorption des molécules dans leur état fondamental ainsi que d'absorption transitoire résolue dans le temps à l'échelle femtoseconde, menée sur une durée d'un peu plus d'une nanoseconde (Fournier et al., 2003).

I.6.3. Excitation à une couleur

I.6.3.1. Généralité

La deuxième forme est basée sur une excitation simultanée résonante par une impulsion laser ultra court (100 fs) dans le NIR. L'énergie totale absorbée est la même que celle de l'absorption à $1-\gamma$ à $\lambda_{\text{NIR}}/2$ et le résultat photophysique et photochimique de ce processus est le même (p. ex. génération de $^1\text{O}_2$) (Figure I.16 (a)). Ce qui exige la conception de Ps de plus grande probabilité d'absorption (section efficace) à $2-\gamma$. Ce dernier paramètre suit de façon quadratique l'intensité d'illumination et cela vient du fait que la probabilité de l'absorption simultanée à $2-\gamma$ dépend du carré du taux local de flux lumineux (Wilson et Patterson, 2008).

En principe cette forme a deux avantages potentiels :

Le premier vient du fait que l'atténuation de la lumière NIR est significativement faible par rapport à la lumière visible (p. ex. 800 versus 400 nm), à cause de la faible absorption (particulièrement l'hémoglobine) et (dans une moindre mesure) la diffusion (Wilson et Patterson, 2008). Ainsi, avec cette méthode on pourrait mieux traiter des tissus situés à des endroits plus profonds. Ceci, en fait, n'est possible que si les trois facteurs suivants sont respectés : (a) la probabilité d'absorption à $2-\gamma$ du Ps doit être supérieur que celle à $1-\gamma$; (b) l'absorption des composantes tissulaires devrait être relativement faible; (c) l'énergie d'excitation devrait être forte, cela est possible en utilisant des sources laser ultras rapides qui donnent de fortes puissances instantanées sans effet thermique; (d) la profondeur de pénétration de la lumière (δ) dans le NIR devrait être deux fois plus grande que celle produite par la moitié de la longueur d'onde, c'est-à-dire $\delta(\lambda_{\text{NIR}}) > 2\delta(\lambda_{\text{NIR}}/2)$. Les deux premiers facteurs sont reliés à la photochimie des Ps alors que les deux derniers dépendent du type de tissu et de la longueur particulière de la lumière (Wilson et Patterson, 2008).

Des études de la TPD à $2-\gamma$ ont été faites sur des fantômes cellulaires et les résultats rapportés montrent des mortalités cellulaires à une profondeur de 4 cm (Spangler et al., 2006). Ils ont aussi démontré dans cette étude que le traitement d'une tumeur implantée (graisse mammaire Pad de la souris), avec la même méthode, n'induit que faiblement ou pas de dommages à la peau et aux organes internes de la souris. De plus, ils ont montré que ce traitement pourrait aller à une profondeur de plus de 1 cm, in vivo, par irradiation directe à travers le côté dorsal de la souris. Le défi substantiel de cette méthode est d'assurer que la photoactivation est vraiment causée par une absorption de la lumière à $2-\gamma$, car une faible absorption résiduelle du Ps à $1-\gamma$ pourrait contribuer à l'effet de la TPD.

Le deuxième avantage potentiel est que la dépendance quadratique de la probabilité d'absorption à $2-\gamma$ peut être exploitée pour donner un confinement spatial exquis de l'effet de la TPD. Cela peut être atteint par focalisation, à l'aide des hautes ouvertures numériques optiques, du faisceau de la lumière laser. Cet effet est largement utilisé dans la microscopie à $2-\gamma$ pour générer des images de haute résolution (réflexion/transmission ou fluorescence) dans le plan focal, même à travers plusieurs centaines de microns de tissu (Zipfel et al., 2003). Similairement, la TPD à $2-\gamma$ a été examinée comme étant une méthode d'irradiation alternative à celle déjà utilisée, à $1-\gamma$. L'utilisation de cette excitation pourrait réduire les dommages latéraux aux

structures adjacentes de la rétine lors du traitement de la DMLA. L'occlusion complète des vaisseaux sanguins a été démontrée in vivo sur un modèle de néovascularization (Samkoe et al., 2007). Aussi, la dépendance quadratique, à l'intensité de la lumière, de la mortalité cellulaire (cellules endothéliales) a été récemment démontrée in vitro (Khurana et al., 2007).

Les principales questions techniques dans cette approche sont (a) comment les faisceaux de la source laser femtoseconde (fs) propageront dans l'œil ? (b) comment les ouvertures numériques et les optiques relativement faibles (plus spécifiquement pour les vieilles personnes) compromettront le confinement spatial ? (Wilson et Patterson, 2008). Le défi technologique de la réalisation de cette thérapie inclut (a) le développement de sources laser fs dans le NIR combinés à un instrument ophtalmologique imagerie/délivrer (p. ex. ophtalmoscope confocal de balayage au laser), (b) la conception/synthétisation de Ps à 2- γ avec de grandes valeurs de section efficace (σ_2) à 2- γ avec des bonnes propriétés pharmacologiques.

1.6.3.2. Détermination de la section efficace

La mesure expérimentale de la σ_2 d'absorption à 2- γ par différentes techniques est connue depuis plus de vingt ans (Twarowski et Kliger, 1977 ; Hermann et Ducuing, 1972). Les mesures directes sont généralement difficiles, car seulement une petite fraction de photons est absorbée pendant le processus d'absorption à 2- γ . Les deux méthodes les plus utilisées pour les mesures expérimentales de la σ_2 sont la méthode de Z-Scan (Sheik-Bahae et al., 1990) et la méthode de fluorescence par excitation à 2- γ (Xu et Webb, 1996).

a) La méthode Z-Scan

La méthode Z-scan est utilisée pour déterminer le coefficient d'absorption non linéaire β de façon précise : on déplace l'échantillon dans le plan focal d'un faisceau gaussien focalisé en mesurant le changement de l'intensité du faisceau réfracté. Plusieurs sources laser peuvent être utilisées pour cette technique. Ces sources laser se différencient par la durée de l'impulsion (picoseconde (Marcano et al., 1996; Rysanyansky et al., 2005), nanoseconde (Rysanyansky et al., 2005) et femtoseconde (Silva et al., 2005; Kyoung et al., 2000) ou par les longueurs d'onde d'émission : monochromatique (750 nm (Kyoung et al., 2000) 775 nm (Oliveira et al., 2006) et 1064 nm (Debrus et al., 2000)) ou polychromatique (utilisant un continuum de lumière blanche « white light continuum Z-scan, WLC Z-scan » (Oliveira et al., 2006 ; Negres et al., 2002). Cette dernière

technique (WLC Z-scan) est plus avantageuse que la méthode Z-scan classique, car elle est plus rapide à cause de l'utilisation d'une source à large bande qui entraîne une multiplicité de longueurs d'onde. La mesure d'un seul spectre d'absorption à $2-\gamma$ prend trois minutes pour une énergie donnée de la source WLC. De plus, le spectre d'absorption à $2-\gamma$ obtenu présente une bonne résolution spectrale (Oliveira et al., 2006).

Dans le cas d'une absorption non linéaire, le champ lumineux dépend de l'intensité lumineuse. Cette dépendance est exprimée par $\alpha = \alpha_0 + \beta I$, où I est l'intensité du laser et α_0 est le coefficient d'absorption à $1-\gamma$. Le coefficient β peut être ensuite déterminé par la mesure du changement de la transmittance à chaque fois que l'échantillon est scanné dans le plan focal. En absence de résonance, comme c'est le cas pour le phénomène de l'absorption à $2-\gamma$, le changement de la puissance transmise est intégré en temps infini pour donner l'énergie de transmission normalisée, suivant l'impulsion gaussienne temporelle :

$$T = \frac{1}{\sqrt{\pi} q_0(z,0)} \int_{-\infty}^{+\infty} L n \left[1 + q_0(z,0) e^{-\tau^2} \right] d\tau \quad \text{Équation 1}$$

où $q_0(z,0) = \beta I_0(t) L (1 + z^2/z_0^2)^{-1}$, L est l'épaisseur de l'échantillon, z_0 est la longueur de Rayleigh, z est la position de l'échantillon dans le plan focal, et I_0 est l'intensité incidente du pulse. Le coefficient non-linéaire β est obtenu à partir de l'équation 1 (Sheik-Bahae, et al., 1990). La σ_2 d'absorption à $2-\gamma$ peut être finalement déterminée par l'équation 2:

$$\sigma_2 = \frac{h\nu\beta}{N} \quad \text{Équation 2}$$

où $h\nu$ est l'énergie du photon absorbé et N est le nombre de molécules par cm^3 (Corrêa et al., 2006). La méthode Z-scan est souvent utilisée pour déterminer la σ_2 d'absorption à $2-\gamma$ ou les paramètres optiques non linéaires des polymères (Shettigar et al., 2006), complexes métalliques (Li et al., 2006), matériaux organiques (Corrêa et al., 2006), nanocomposites Or:Silice (Debrus et al., 2000), nanoparticules (Kyoung et al., 2000; Ryasnyansky et al., 2005) cristaux liquides (Gómez et al., 2003 ; Ying-Guey, et al., 2005).

Les avantages de cette technique résultent de la détermination, en un seul scan, du coefficient d'absorption nonlinéaire β , ainsi que de la σ_2 d'absorption à $2-\gamma$. De plus, la détermination de la σ_2 d'absorption à $2-\gamma$, avec cette technique, sur des espèces non luminescentes demeure possible.

b) La méthode de fluorescence par excitation à deux photons

En 1995, Fischer et ses collègues rapportèrent des spectres d'absorption à 2- γ pour des coumarines et xanthines en utilisant la méthode de fluorescence par excitation à 2- γ (Fischer et al., 1995). La même année, Webb, Denk et leurs collègues ont introduit une amélioration remarquable à cette technique pour décrire pour la première fois les spectres d'absorption à 2- γ des colorants souvent utilisés en absorption à 2- γ . Cet article est devenu une référence mondiale pour les mesures effectuées par différentes équipes de recherche (Xu et al., 1995).

La fluorescence par excitation à 2- γ est une bonne approche pour déterminer la σ_2 d'excitation à 2- γ , à condition que le matériau étudié soit fluorescent avec un rendement quantique de fluorescence (Φ_F) connue.

La source d'excitation est un laser mode-locked Titane-Sapphire (Ti- Sapphire) délivrant des impulsions de quelques dizaines de fs (typiquement 150 fs), avec un taux de répétition voisine de 80 MHz, pour la région spectrale 700-1050 nm. L'échantillon est placé dans une cuve à fluorescence, de telle façon qu'elle englobe le point focal du système optique. La fluorescence est collectée par un monochromateur, placé à un angle de 90° par rapport au faisceau laser, vers un spectromètre relié à un ordinateur qui affiche les intensités de fluorescences émises. Comme il est difficile de déterminer tous les paramètres expérimentaux mis en jeu dans cette technique, on utilise un colorant de référence dont on connaît le spectre d'absorption à 2- γ ainsi que le Φ_F . Ainsi, la σ_2 d'absorption à 2- γ peut être déterminée d'une façon indirecte en mesurant le signal de fluorescence par excitation à 2- γ . De ce signal de fluorescence, on peut déterminer la σ_2 d'excitation à 2- γ notés σ_{2PE} . Cette valeur est proportionnelle à la σ_2 d'absorption à 2- γ avec une constante de proportionnalité qui est le rendement quantique de fluorescence (Φ_F) du fluorophore :

$$\sigma_{2PE} = \Phi_F \sigma_2 \quad \text{Équation 3}$$

Le nombre de photons absorbés par un processus à 2- γ N dans le volume du point focal (de l'ordre du femtolitre) d'une illumination fortement focalisée est relié au nombre de photons de fluorescence F collectés par l'appareil expérimental :

$$F = \frac{1}{2} \kappa \Phi_F N \quad \text{Équation 4}$$

où κ est l'efficacité du détecteur utilisé. L'introduction du facteur 1/2 est due au fait que 2- γ sont absorbés quand le fluorophore est excité. La quantité mesurée expérimentalement est la valeur moyenne du nombre de photons de fluorescence $\langle F \rangle$. Le développement de l'équation 2 (Xu et Webb 1996) fait intervenir un paramètre K, qui inclut la fonction κ et comprend aussi des paramètres expérimentaux, tels que la puissance moyenne de la source laser (en photon.s^{-1}) et la longueur d'onde d'excitation (en cm) :

$$\langle F \rangle = \frac{1}{2} K C n \Phi_F \sigma_2 \quad \text{Équation 5}$$

où C est la concentration de la solution de colorant et n est l'indice de réfraction du solvant utilisé. La détermination expérimentale de K est une tâche ardue. Pour éviter les complications lors de cette mesure, on utilise un produit de calibration standard comme référence, ayant une σ_{2PE} et un spectre d'excitation à 2- γ connus. Après avoir calibré le signal de fluorescence du nouveau fluorophore par le signal de fluorescence de la référence, le rapport entre ces deux signaux détermine la σ_2 du nouveau fluorophore. Pour une longueur d'onde d'excitation donnée, K est le même pour la référence et le fluorophore étudié, donc le rapport des signaux de fluorescence mesurés donne :

$$\frac{\langle F \rangle_{Ref}}{\langle F \rangle_{Mes}} = \frac{\Phi_{FRef} C_{ref} \sigma_{2Ref} n_{Ref}}{\Phi_{FMes} C_{Mes} \sigma_{2Mes} n_{Mes}} \quad \text{Équation 6}$$

où les indices Ref et Mes des différents paramètres correspondent à la référence et au fluorophore mesurés respectivement. Après la détermination de tous ces paramètres indépendants du montage expérimental utilisé, la σ_2 d'absorption à 2- γ issue de l'équation 6 peut être calculée par l'équation-7 suivante (Albota et al., 1998):

$$\sigma_{2Mes} = \frac{\Phi_{FRef} C_{ref} n_{Ref} \langle F \rangle_{Mes} \sigma_{2Ref}}{\Phi_{FMes} C_{Mes} n_{Mes} \langle F \rangle_{Ref}} \quad \text{Équation 7}$$

Finalement, cette méthode présente une sensibilité beaucoup plus importante que celle des autres méthodes comme la méthode Z-scan (Sheik-Bahae, 1990), la méthode Thermal blooming (Twarowski et Kliger 1977), et la méthode décrite par Hermann en 1972 (Hermann et Ducuing, 1972).

Mesure du rendement de fluorescence à un photon

Quand un fluophore absorbe $1-\gamma$, il passe à un état excité plus énergétique. Le sort de cet état varie selon la nature exacte du fluophore et son environnement. Ainsi, il pourrait se désactiver (perte d'énergie) et retourner à l'état fondamental. Les principaux processus de désactivation sont la fluorescence (perte d'énergie par émission de photon), CI, relaxation vibrationnel (perte d'énergie non radiative par la chaleur) et CIS vers l'état triplet.

Le Φ_F est l'efficacité relative de la fluorescence comparée aux autres voies de désexcitation (= nombre de photons émis/nombre de photons absorbés). La méthode comparative est la plus fiable pour mesurer Φ_F (Williams et al. 1983). Elle est basée sur l'utilisation d'une molécule de référence bien caractérisée ayant une valeur de rendement de fluorescence connue. Essentiellement, dans cette technique, on assume que la solution de la référence et l'échantillon, avec une absorbance identique à la même longueur d'onde, absorbent le même nombre de photons. Ainsi, un simple rapport entre les intensités de fluorescences intégrées des deux solutions (enregistrées sous conditions identiques) donnera un ratio des valeurs des rendements quantiques de fluorescence. La valeur absolue de Φ_F est calculée suivant l'équation :

$$\Phi_F(X) = \Phi_F(Std) \left(\frac{Grad_X}{Grad_{Std}} \right) \left(\frac{\eta_X^2}{\eta_{Std}^2} \right) \quad \text{Équation 8}$$

où les indices Std et X représentent le standard et l'échantillon, successivement, Φ_F est le rendement quantique de fluorescence, Grad est le gradient de la courbe de l'intensité de fluorescence intégré, versus l'absorbance, et η est l'indice de réfraction des solvants. La mesure du Grad est faite suivant le guide Jobin Yvon HORIBA, dans lequel la procédure détaillée, ainsi que les considérations expérimentales générales sont bien clarifiées (www.jyhoriba.co.uk).

I.7. Objectifs du projet de recherche

Le principal objectif de cette étude est de contourner les inconvénients de la TPD à $1-\gamma$, déjà cités ci-dessus, par un nouveau protocole d'irradiation biphotonique (une et deux couleurs). Ainsi notre travail est basé sur deux parties :

L'objet de la première partie, qui est basé sur l'excitation à deux couleurs pour le traitement du cancer, fut établi par les étapes suivantes :

- Le développement d'une méthode expérimentale in vitro qui nous permettra d'étudier la faisabilité de la TPD à 2- γ .
- L'application in vitro de la TPD à 2- γ en utilisant le CuPcS₄ comme Ps. Ceci en se basant sur l'étude photophysique faite sur cette molécule (Fournier et al., 2003)
- L'application de cette méthode sur des entités biologiques, comme les cellules cancéreuses et l'enzyme ACE, dans un milieu hypoxique.
- La quantification de la production de ¹O₂ par cette molécule et son analogue diamagnétique (ZnPcS₄) à différents pO₂.

La deuxième partie de ce projet de recherche vise à déterminer le potentiel des Pc comme agent actif pour la TPD à 2- γ , par des sources laser ultracourts (~ 100 fs), pour le traitement de la DMLA. Ainsi, l'objet de cette partie constitue les étapes suivantes :

- Le développement d'un montage expérimental permettant la mesure de la fluorescence à 2- γ , suite à une excitation par une source laser fs dans le NIR.
- La mesure de la σ_2 d'absorption à 2- γ pour des Pc ayant été synthétisés dans notre laboratoire et ayant démontré leur efficacité pour la TPD à 1- γ .
- La comparaison entre la capacité d'absorption à 2- γ de ces séries de Pc et le Photofrin (Ps archétypique utilisé actuellement en clinique en TPD à 1- γ).

CHAPITRE II. PREMIER ARTICLE

Youssef Mir, Daniel Houde and Johan E. van Lier, Two-photon absorption of copper tetrasulfophthalocyanine induces phototoxicity towards Jurkat cells in vitro, Photochemical and Photobiological Sciences, 2006, 5, 1024-1030.

II.1. Buts

Le but de cet article est l'étude, in vitro, de la faisabilité de la TPD à 2- γ sur des cellules cancéreuses Jurkat. L'agent photosensibilisant utilisé est le CuPcS₄. Deux sources de lumière ont été utilisées; la première est monophotonique et émet de la lumière en continu (680 nm) alors que la deuxième est biphotonique et émet de la lumière pulsée (532 nm, 8 ns). Le choix des sources a été fait selon l'étude photophysique de la molécule. Dans ce travail, la concentration de ¹O₂ a été quantifiée suite à l'excitation par les deux sources. Par ailleurs, la rétention cellulaire a été mesurée en utilisant le ZnPcS₄ comme Ps, à cause de la non-fluorescence de la molécule CuPcS₄.

II.2. Hypothèses

L'étude photophysique détaillée de la molécule du CuPcS₄ montre que ce Ps pourrait être excité à ²S₁ et à trois états triplets. Le temps de vie du triplet ⁴T₁ a été établi à 5 ns alors que les transitions ²S₁ → ²T₁ → ⁴T₁ se font dans un délai de 2.2 ± 0.2 ps et 400 ± 60 ps, successivement. Ainsi, pour induire une action biphotonique, le délai entre les 2- γ devrait être autour de 5 ns. Le spectre d'absorption transitoire de la molécule CuPcS₄ a révélé que l'état excité triplet absorbe dans l'intervalle 475-550 nm. Ainsi, on a décidé de prendre comme source un laser Yag qui émet à 532 nm avec une durée d'impulsion de 8 ns. Donc, avec cette source laser, et à l'intérieur d'une impulsion, ce Ps pourrait être excité à l'état triplet T₁ puis ré-excité à l'état supérieur T_n.

Two-photon absorption of copper tetrasulfophthalocyanine induces phototoxicity towards Jurkat cells in vitro.

Youssef Mir, Daniel Houde* and Johan E. van Lier

Department of nuclear medicine and radiobiology, Faculty of medicine and health sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke (Québec) Canada J1H 5N4.

Fax: (819) 564-5442; Tel: (819) 346-1110 (14345)

E-mail: Daniel.Houde@usherbrooke.ca

Received 19th May 2006, Accepted 8th September 2006
First published as an Advance Article on the web 20th September 2006

Abstract

The feasibility to induce oxygen-independent tumour cell kill by two-photon excitation of copper tetrasulfophthalocyanine (CuPcS₄) was studied in Jurkat cells in vitro. Following incubation with CuPcS₄ cells were transferred to a closed cuvette and irradiated with 532 nm pulsed-laser or 680 nm continuous-laser light to evaluate the effect of either two- or one-photon excitation, respectively. Cell survival was measured using MTT and Trypan blue exclusion tests. Cell viability decreased 10-20% following two-photon excitation while one-photon illumination did not affect cell survival. These data confirm that two-photon excitation of CuPcS₄ to the upper excited triplet state results in the formation of toxic species suggesting its potential use as a sensitizer for the photodynamic treatment of poorly oxygenated tumours.

Introduction

Photodynamic therapy (PDT) is a promising new treatment¹⁻³ that combines a photosensitizer (Ps), molecular oxygen and light of an appropriate wavelength to destroy cancer cells. For a typical PDT procedure, the Ps is administered either iv or topical, reaching optimal tumor-to-non target ratios between several up to 72 hours after administration, at which time the tissue is exposed to red light.⁴ Excitation of the Ps results in the formation of reactive oxygen species (ROS) that are responsible for the overall cytotoxic effect.^{3,4} Depending on the localization of the Ps, tumor regression may result from direct cell kill, or from initial vascular shut-down.⁴⁻⁶ In addition, PDT may activate the immune system that also can affect the tumour cells.⁴

The photo-excited triplet Ps may react via a type I or a type II mechanism.⁷ The type I mechanism involves interaction with substrate molecules via hydrogen abstraction or electron transfer to yield radical and ionic species that in turn may react with molecular oxygen to give ROS. Alternatively the sensitizer can react directly with ground state molecular oxygen to yield singlet oxygen (type II mechanism) that reacts with a large number of biological substrates to initiate oxidative chain reactions resulting in cell and tissue damage. Both mechanisms rely on the presence of oxygen, with the type II mechanism being the most widely accepted pathway leading to cell death.⁸⁻¹⁰ The necessity for molecular oxygen in either pathway can greatly limit the potential of PDT in solid tumours where important

hypoxic regions may exist.² The necessity of molecular oxygen in PDT can in theory be circumvented via a two-photon activation of the Ps in the Q band region. This allows the Ps to reach a higher triplet excited state, capable of inflicting biological damage in the absence of molecular oxygen.^{11,12} Although many studies have confirmed that a two-photon mechanism leads to the production of toxic species, including radicals that may induce chain reactions,^{15,17} and inactivation enzymes in vitro,¹³ only a single communication by Smith et al.¹⁴ has appeared suggesting that such a process may actually lead to cell inactivation. In the latter study the authors showed that following sequential two color laser excitation of Rose Bengal the upper triplet excited state T_n could be populated selectively to produce toxic species, including a one-electron semi-oxidized RB^+ radical, identified by its characteristic absorption maximum at 470 nm.¹⁸

We previously showed that water-soluble tetrasulfonated phthalocyanine containing a paramagnetic Cu^{++} central metal ion ($CuPcS_4$) can be excited to a 2S_1 and three triplet states (Figure II.1).¹⁹ The life time of the 4T_1 state was established to be 5 ns and those of the $^2S_1 \rightarrow ^2T_1 \rightarrow ^4T_1$ transition states 2.2 ± 0.2 ps and 400 ± 60 ps, respectively. The first order rate constants k_1, k_2, k_3, k_4, k_5 were found to be $2.0 \pm 0.5, 460 \pm 120, 2.3 \pm 0.9, 2.5 \pm 1.0$ and 0.2 ± 0.1 ($\times 10^9 s^{-1}$), respectively. Thus, to induce the two-photon action, the time delay between the two photons for two-photon excitation should be around 5 ns. The transient absorption spectrum of $CuPcS_4$ reveals that the triplet excited state absorbs in the range of 475-550 nm and 700-750 nm (Figure II.2). Since the absorption intensity in the range of 475-550 nm is significantly greater as compared to that of the Q-band region, and since the higher excited triplet state $T_n \rightarrow T_1$ of $CuPcS_4$ is characterized by its fluorescence at 527 nm,²⁰ we selected a 8-ns pulsed, 532 nm laser to populate the upper electronic T_n state. In this paper we report the effect of two-photon excitation of $CuPcS_4$ on Jurkat cells in vitro and suggest a potential application in PDT under hypoxic conditions. Comparison between the cell phototoxicity after one and two-photon excitation was made and special attention was paid to population mechanisms of the higher excited states of this Ps.

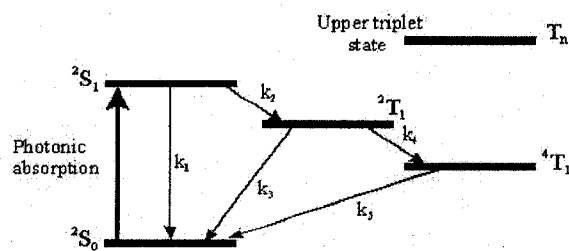


Figure II.1 Energy level diagram for CuPcS₄.

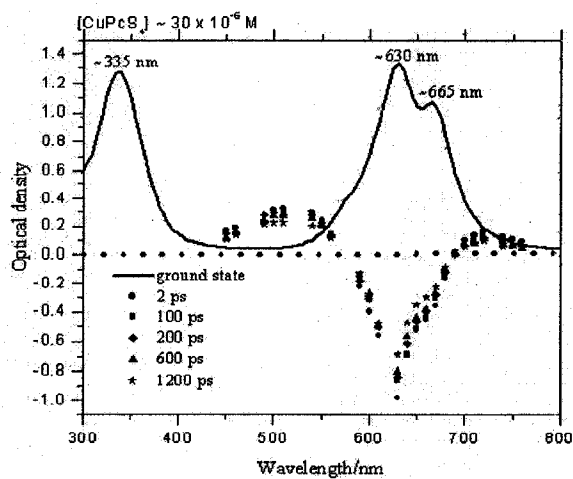


Figure II.2 Ground-state and transient absorption spectra for CuPcS₄.

Experimental

Photosensitizers

CuPcS₄ (Figure II.3) was prepared via the condensation method adapted from Weber and Bush,²¹ modified as detailed by Fournier et al.¹⁹ ZnPcS₂ and ZnPcS₄ were prepared via condensation of sulfonated precursors and purified by extensive C-18 reversed-phase HPLC fractionation (Waters Corp.; Column: RCM 8 ×10, Millipore), using a linear gradient from 100% aqueous 5.0 mM phosphate buffer (pH=5) to 100% methanol over 30 min (1.5 mL/min).²² Samples of each Ps were dissolved in PBS (Phosphate buffer saline, pH=7.4) at a concentration of 3×10^{-4} M, sterile filtered over a 0.22 μ m filter and stored in the dark at 4 °C.

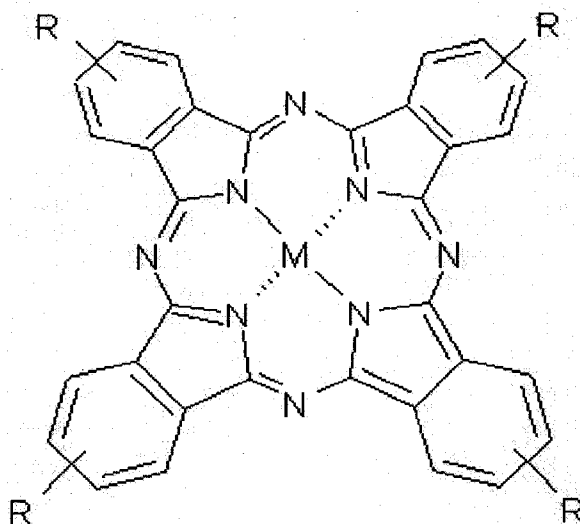


Figure II.3 Metallo sulfophthalocyanine. CuPcS₄: M=Cu, R=SO₃Na; ZnPcS₄: M=Zn, R=SO₃Na; ZnPcS₂: M=Zn, 2(R) =H and 2(R) = SO₃Na on adjacent benzyl rings.

Singlet oxygen measurements

Singlet oxygen concentrations after two and one photon excitation were measured in DMF using 9,10-diphenylanthracene (DPA, Aldrich) as a chemical trap.²³ Under conditions the Ps is in a monomeric form.²⁷ Briefly, 1mL of 2 μ M Ps in DMF, containing different concentration of DPA, was irradiated with 532 nm pulsed-laser light (10 Hz, 8 ns pulse delay) delivered by a Nd:YAG laser (Lumonics) or a fibre-coupled, 670 nm, c.w. laser system, set at 270 mW (B&W TEK). Experiments were repeated 2-4 times for each DPA concentration. DPA and Ps concentrations were monitored before and after irradiation by the intensity of their absorption maxima at 395 nm

and 675 nm, respectively, measured with a spectrophotometer (HITACHI, U-2000). Upon oxidation DPA is converted to the stable 9,10-diphenylanthracene endoperoxide (DAP), lacking the absorbance at 395 nm, and the loss of DPA is directly proportional to the amount of singlet oxygen produced.^{24,25} Any loss of Ps is attributed to photo-oxidation.

Cell culture and incubation conditions

Human T-lymphocytes (Jurkat cells: clone E6-1, human acute T-cell leukaemia, ATCC) were cultivated in 75 mL-flasks in 15 mL growth medium²⁶ (RPMI-1640 containing L-glutamine, Sigma, supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% penicillin streptomycin). Cells were maintained at 37 °C under 5% CO₂ and seeded in fresh medium every 2-3 days. Cell concentrations were kept between 10⁵-10⁶ viable cells/mL, counted before each experiment and evaluated for the monoploidy of the population (Coulter Channelyzer, model C-1000 in conjunction with the Coulter Counter model ZBI, Coulter Electronics, Inc.).

Cell uptake

We selected the strongly fluorescing ZnPcS₄ as a reference to predict cellular uptake kinetics of the analogous CuPcS₄, which does not fluoresce. Substitution of the central metal Cu⁺⁺ ion for Zn⁺⁺ has little effect on the overall charge and hydrophilicity of the Ps, i.e. the principal factors that determine the biodistribution of the complex. Approximately 1x10⁶ cells were seeded in 25 cm² tissue culture flasks. After 24 h, cells in growth medium containing 9–100 µM ZnPcS₄ were incubated at 37 °C under 5% CO₂ in 96 multiwell plates (1 mL per well) for periods of 1, 6 and 24 h. At the end of the incubation period, the medium was removed and the cells were washed twice with PBS. The cells were lysed with 100 µL of 0.1 N NaOH. An aliquot (20 µL) was removed to determine cellular protein according to the Bradford method (Bio-Rad Protein Assay).²⁸ The remaining cell lysate was diluted with DMF (400 µL) and PBS (20 µL), and ZnPcS₄ concentrations were measured by fluorescence spectroscopy (F-2000, Hitachi; λ_{ex} = 607 nm, 5 nm band-pass, λ_{em} = 682 nm, 5 nm band-pass). ZnPcS₄ cell concentrations were expressed as nmoles of Ps per mg of protein. The protein content of the cells was measured separately and established to be 161±14 µg protein/10⁶ cells.

Irradiation conditions

Continuous photon excitation. Cells were incubated with 9 μM of ZnPcS_2 , ZnPcS_4 or CuPcS_4 , placed in 96 micro-well plates (100 μL /well containing 1×10^5 cells; Light path = 5 mm) and irradiated for 30 min using red light (660-700 nm) from two 500W tungsten/halogen lamps (GTE Sylvania) fitted with a circulating refrigerated filter containing aqueous rhodamine B (Sigma) ($\text{OD}_{580} = 1.25$). The fluence rate was fixed at 10 mW cm^{-2} .³¹ These conditions are comparable to those used for conventional PDT protocols.²⁹⁻³¹ The incident fluence rate was measured with a photometer (Li-Cor, model Li-185B). After 24 h cell survival was measured by the MTT colorimetric assay. Sixteen-fold replicates were run and experiments were repeated at least twice.

Pulsed photon excitation. Fresh growth medium (10 mL) containing approximately 5×10^5 cells/mL were seeded in 25 cm^2 culture flasks, fortified with or without CuPcS_4 (3-60 μM , in PBS) and incubated for 24 h at 37°C under 5% CO_2 . At the end of the incubation period, the medium was removed and the cells were washed twice with PBS, re-suspended in fresh medium and counted. Two mL of the cell suspension (1×10^6 cells/mL) were placed in a 2.5 mL quartz cylindrical cell fitted with a Teflon stopper (path length = 10 mm), stirred gently and continuously with a magnetic spin bar (8/0.5 mm, VWR International) and the entire quartz cell was irradiated with 532 nm pulsed laser light (10Hz, 8 ns pulse-width) delivered by a Nd:YAG laser (Lumonics). Dark controls were prepared in the same manner. After irradiation, cells were placed in 96 micro-well plates (100 μL /well) and incubated 24 h at 37°C under 5% CO_2 . Cell survival was measured both by the MTT assay (16 duplicates, twice) and the Trypan Blue exclusion test (4 duplicates).

Cell viability

MTT assay. The MTT assay measures mitochondrial hydrogenases activity and was adapted from the method described by Tada et al.³² Briefly, a stock solution of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma)³³ in 0.5% in PBS was diluted 5-fold in growth medium, and 50 μL was added to 100 μL of cell suspension. After 3 h, 100 μL of a sodium dodecyl sulfate solution (10% in 0.01 N HCl) was added to the cells to stop the reaction and to dissolve the blue formazan crystals produced by mitochondrial hydrogenase reduction of the MTT.³⁴ After incubation overnight at 37°C under 5% CO_2 , the plates were read on a microplate

reader (Synergy HT, BIO-TEK Instrument Inc.) and the formazan absorbance at 570 nm was recorded.

Trypan Blue Exclusion assay. This test was conducted accordingly to the product information sheet, catalogue 07050, Stemcell Technologies Inc. Cells were diluted 1:1 in 0.4% Trypan blue (Sigma) in PBS. When the cell count was too high, cells were diluted with a balanced salt solution before Trypan blue was added. After incubation for 5-15 min, non-viable cells were counted by a Neubauer hemacytometer, only non-viable cells will stain with the Trypan blue dye. The cell viability was expressed as % surviving cells, i.e. the number of viable cells divided by the total cell count, times 100%.

Results and discussion

Electronic spectra

The absorption spectra of CuPcS₄ and ZnPcS₄ (20 μ M) in different solvents are shown in Figure II.4. In water, ZnPcS₄ shows characteristic Q-band maxima of the monomeric dye at 670 nm and aggregated species at 640 nm.²⁷ In DMF, PBS (pH=7.4) or growth medium, ZnPcS₄ disaggregates resulting in an increase in the 670 nm absorption band and a decrease at 640 nm.²⁶ The monomeric form is responsible for singlet oxygen production, which is important for conventional PDT applications.³⁶ CuPcS₄ exhibits a similar absorption spectrum in water and DMF as ZnPcS₄ with maxima at 630 nm and 665 nm in water and a strong shift toward the monomeric form at 675 nm in DMF.²⁷ However in growth medium and PBS, the absorption spectrum of CuPcS₄ differs substantially from that of ZnPcS₄. The latter substantially monomerizes in PBS or growth medium at physiological pH, while the CuPcS₄ remains aggregated with the overall absorption intensity diminishing. CuPcS₄ in aqueous solutions exhibits a pronounced tendency to form ring-stacked dimers (or polymers).³⁷ It is well known that aggregation of phthalocyanine molecules arises from the strong π - π interaction that stabilize columnar aggregates,³⁸ explaining why CuPcS₄ remains in a dimeric form in PBS and culture medium. It is also known that ionic screening provided by the salt reduces the repulsion between charges on the solute molecules resulting in a decrease in the molar absorption coefficients at 626 nm and 665 nm of CuPcS₄, even at low sodium chloride concentrations.³⁹ Since both PBS and

culture medium contain salt, this may explain the observed decrease in the intensity of the absorption spectrum of CuPcS₄ in these media.

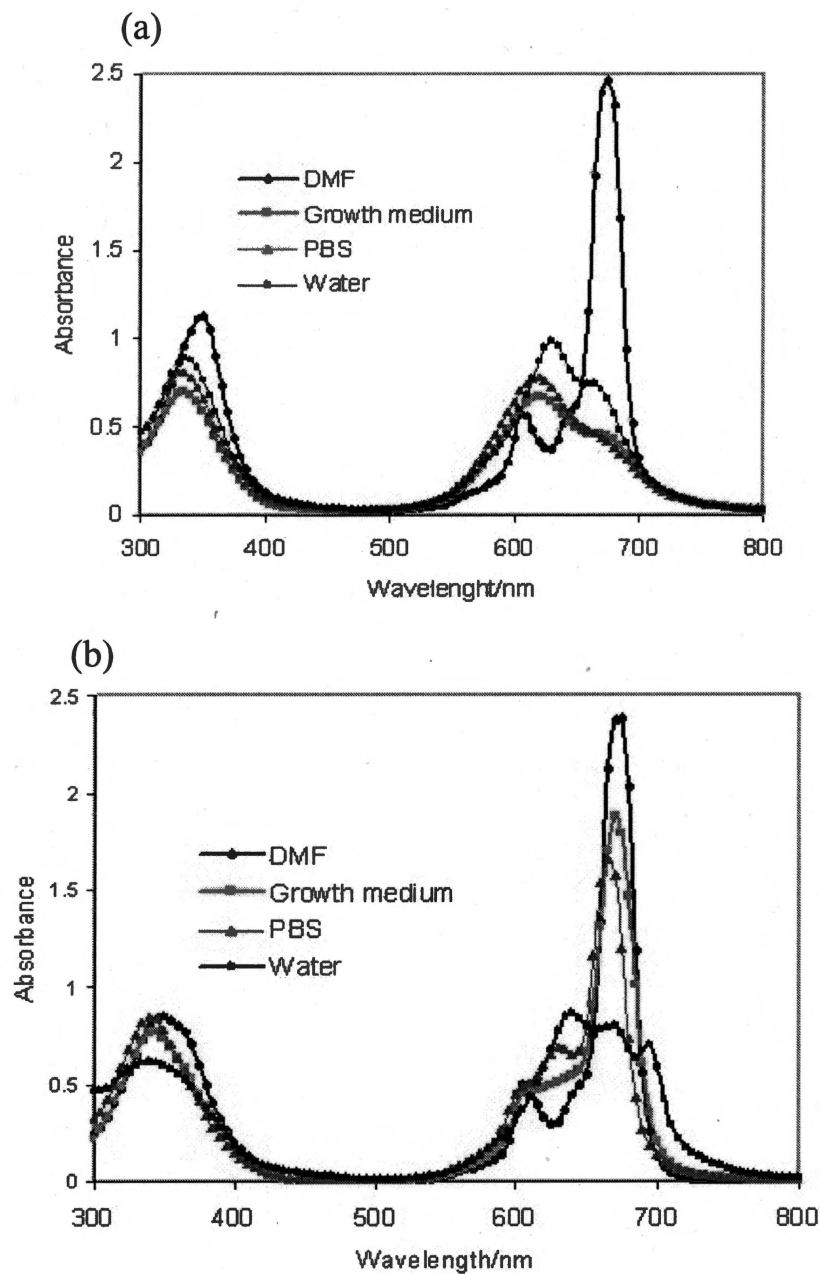


Figure II.4 Absorption spectra of 20 μM CuPcS₄ (a) and 20 μM ZnPcS₄ (b) in different solvents.

Table II.1 Singlet oxygen concentration and (%) photodegradation of CuPcS₄ and ZnPcS₄ after different irradiation conditions.

Ps	Time/m in	Fluence rate/photons cm ⁻² s ⁻¹	λ /nm	(%) PD	[¹ O ₂]/ μM
CuPcS ₄	3	2.24x10 ¹⁷	670	9.94	0.042
	30	1.51x10 ¹⁶	532	19.6	0
ZnPcS ₄	1	2.28x10 ¹⁷	670	32.49	0.51
	30	1.46x10 ¹⁶	532	24.32	0.3

Singlet oxygen production

Singlet oxygen yields under different irradiation condition are summarized in Table II.1. At 670 nm, using continuous irradiation conditions, the monomeric CuPcS₄ produces a small amount of singlet oxygen. In contrast, the analogous ZnPcS₄ produces a 36-fold higher quantity of singlet oxygen under the same experimental conditions. This is in agreement with previous studies,⁴⁰ conducted in 30% methanol in water employing L-tryptophan as chemical trap and in toluene using 2,2,6,6-tetramethylpiperidine as a chemical trap.⁴¹ No singlet oxygen was produced by CuPcS₄ with 532 nm pulsed-laser light (Table II.1). Furthermore, monomeric CuPcS₄ was found to be more resistant to photodegradation than ZnPcS₄ (Table II.1). Even after prolonged irradiation periods of 1 h, using 670 nm continuous or 532 nm pulsed laser light, CuPcS₄ failed to produce any degradation products (data not shown). This suggests that Ps photodegradation represents mainly oxidative damage and as such is directly related to the Ps' capacity to produce singlet oxygen.

Cell uptake

The effect of the Ps concentration on Jurkat cell uptake was studied with ZnPcS₄ and the results are shown in Table II.2. Cell uptake increased with both with Ps concentration and incubation times, reaching optimal levels after 24 h. The latter incubation time was used throughout our studies. These observations are in agreement with uptake data reported for other cell lines, i.e. EAhy 926 and RIF-1 cells using Raman mapping⁴² or fluorescence

microscopy.⁴³ The latter studies showed that after initially being taken up by the plasma membrane, the Ps mainly concentrates in the Golgi apparatus.

Table II. 2 Effect of the ZnPcS₄ concentration on Jurkat cell uptake after different incubation times.

ZnPcS ₄ (μ M)	ZnPcS ₄ in nmol/mg of cell protein ^a		
	1 h	6 h	24 h
9	0	0.10 \pm 0.03	0.27 \pm 0.10
15	0	0.08 \pm 0.05	0.51 \pm 0.1
30	0	0.12 \pm 0.04	0.80 \pm 0.27
45	0	0.24 \pm 0.05	0.92 \pm 0.11
60	0.004 \pm 0.0	0.76 \pm 0.23	1.33 \pm 0.29
80	0.08 \pm 0.02	0.92 \pm 0.23	1.40 \pm 0.33
100	0.13 \pm 0.03	0.97 \pm 0.24	1.44 \pm 0.17

^a Average of eight experiments \pm standard deviation.

Irradiation experiments

Continuous photon excitation. Viability of Jurkat cells (MTT assay) after incubation with different Ps at 9 μ M and exposure to red light (660-700 nm) are presented in Figure II.5. Both reference Ps, i.e. ZnPcS₄ and ZnPcS₂ exhibit strong conventional photodynamic activities. The amphiphilic ZnPcS₂ was included in these one-photon experiments since disulfonated Pcs were previously shown to exhibit particularly high photocytotoxic properties.³⁴ This was confirmed in our present results revealing that ZnPcS₂-PDT induced 100% mortality at a light dose of 18 J cm⁻². Under the same condition the hydrophilic ZnPcS₄ showed 90% mortality. In contrast, using the same experimental conditions with CuPcS₄ as Ps, no decrease in cell viability was observed, with cell survival being identical to that observed with the control cells. Moreover, illumination with 514 nm continuous light (Argon ion laser, 6 W, Coherent Inc., Innova 90 model) did not result in any decrease in cell viability (data not shown). These results confirm that no singlet oxygen was produced by CuPcS₄ under these irradiation conditions. Furthermore, the absence of a

conventional PDT response implies that CuPcS_4 will be void of unwanted side effects such as skin and ocular phototoxicity.

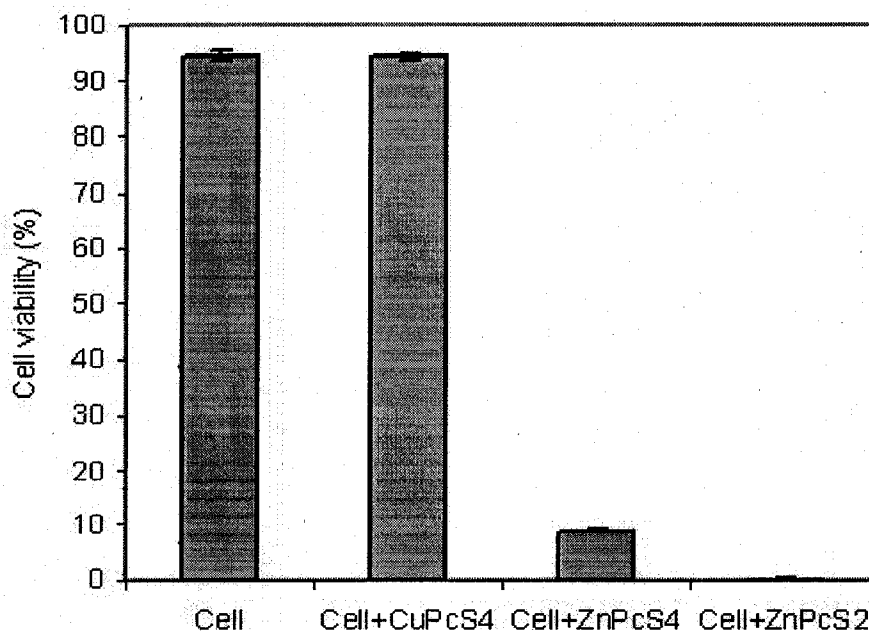


Figure II.5 Viability of Jurkat cells incubated with different Ps following continuous irradiation with red light. Cells were incubated with $9 \mu\text{M}$ of Ps, placed in 96 micro-well plates and irradiated for 30 min with 660-700 nm red light (fluence 18 J cm^{-2}). Incubation times post- and pre-irradiation were set at 24 h. Cell survival was measured by the MTT colorimetric assay.

Pulsed photon excitation. Figure II.6 illustrates the cell viability (MTT assay) of CuPcS_4 -treated Jurkat cells ($60 \mu\text{M}$) exposed to 532 nm pulsed-laser light (fluence 12.8 J cm^{-2}) as a function of the total volume of treated cells. At the largest volume of 2 mL cell survival was $88.5 \pm 1.56\%$ (p value = 0.0013); reducing the volume to 1 mL decreased survival to $81.3 \pm 4.12\%$ (p value = 0.0008). It thus appears that the volume of the irradiated cells has a small effect on cell viability, which may relate to different factors such as cell damage due to mechanic agitation or a thermal effect. To verify the latter we measured the change in temperature during the illumination of culture medium with a thermal probe (Bailey Instruments digital thermometer, model Bat 8). The temperature of 1 mL increased from 26°C to 28.9°C during the 30 min of irradiation, whereas irradiation of 2 mL resulted in an increase of 26°C to 28.5°C . This small rise in temperature

excludes any thermal effect on cell survival. For all subsequent experiments we selected a 2 mL irradiation volume.

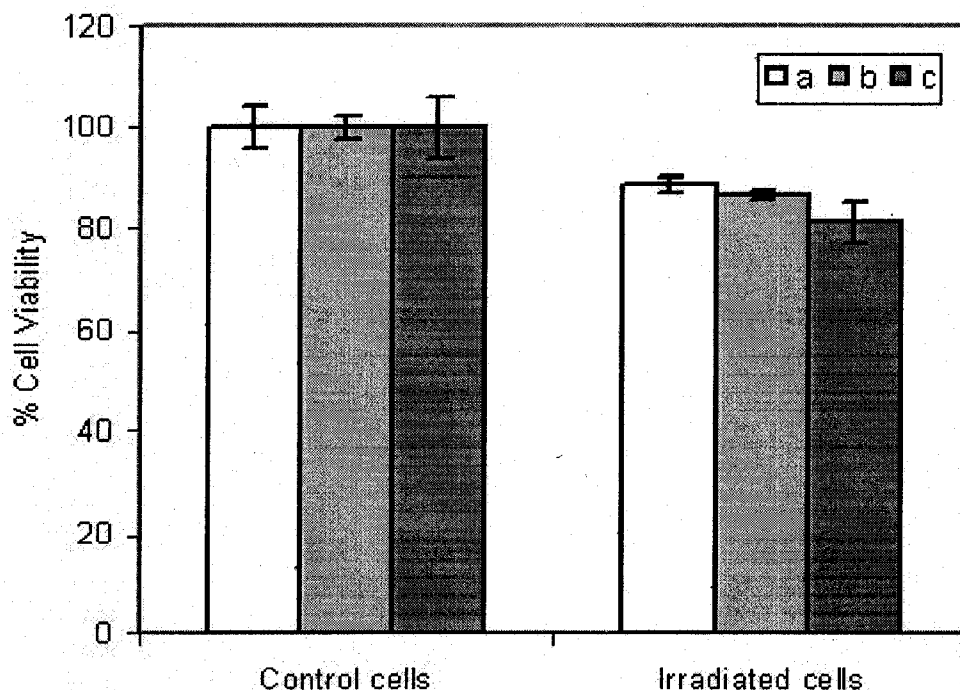


Figure II.6 Viability of Jurkat cells after incubation with CuPcS₄ (60 μ M) in different total volumes (a: 2 mL; b: 1.25 mL; c: 1 mL). Control cells were kept in the dark, irradiated cells were exposed to pulsed-light at 532 nm, 8 ns intervals (fluence 12.8 J cm⁻²). Incubation times post- and pre-irradiation were set at 24 h. Cell survival was measured by the MTT colorimetric assay.

An incremental increase the CuPcS₄ concentration from 0-30 μ M, following exposure to pulsed 532 nm laser light (fluence 17.6 J cm⁻²) resulted in decreased cell viability, which stabilized at ~75% (p value = 2×10^{-7}) at a Ps concentration of 15 μ M (Figure II.7). Increasing the Ps concentration to 30 μ M did not further affect cell viability. This stabilization of photocytotoxicity may relate to a number of factors including Ps cell uptake saturation (Table II.1) and loss of therapeutic light due to auto-absorption.

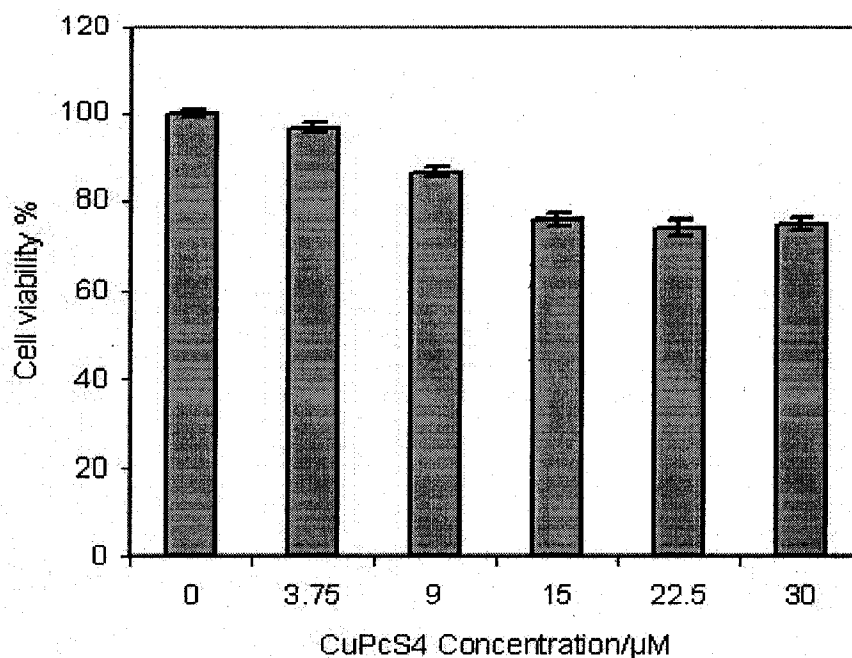


Figure II.7 Viability of Jurkat cells after incubation with different concentrations of CuPcS₄ (total volume 2 mL) following irradiation with pulsed-light at 532 nm, 8 ns intervals (fluence 17.6 J cm⁻²). Incubation time post- and pre-irradiation were set at 24 h. Cell survival was measured by the MTT colorimetric assay.

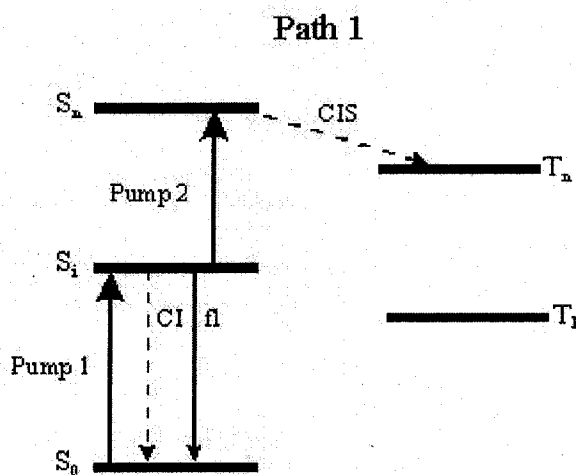
To confirm that the viability values observed via the MTT assay indeed correlated with cell survival, we also tested cell viability after incubation with 30 μM and 60 μM CuPcS₄ and exposure to pulsed 532 nm laser light (fluence 18.08 J cm⁻²) using the TBE assay. Cell viability decrease from 89.7 \pm 3% for 30 μM Ps to 80.2 \pm 6.38% for 60 μM Ps, with control survival values (i.e. without light) of 96.2 \pm 0.52% and 95.4 \pm 2.34%, respectively. These findings suggest that cell death may to a large effect involve membrane damage, which is in agreement with previous observations made on in vitro cell inactivation after ZnPcS₄-PDT.⁴³

Using either the MTT or TBE assay our two-photon action caused 10-20% cell death, which is significantly higher than previously reported cell survival values using Rose Bengal as two-photon Ps.¹⁴ Nevertheless the choice of CuPcS₄ as Ps has some limitations related to the hydrophilic character of the Ps that limits cell uptake, the tendency of CuPcS₄ to aggregate under physiological conditions that reduce its photocytotoxicity (both in continuous and two-photon conditions), and finally the weak absorbance of the ground-state at 532 nm. The latter limitation

could be improved upon through the use of higher pulsed laser light at ~ 630 nm combined with light from a 532 nm pulsed laser. This may provide an efficient way to obtain the triplet excited state T_1 while favouring the population of upper excited state T_n . We recently tested this hypothesis using two continuous light sources and acetylcholinesterase (ACE) as a target, and confirmed that enzyme inactivation occurred via a sequential, two-photon pathway.⁴⁵

Two-photon excitation mechanism

The observed photodestruction of Jurkat cells with 532 nm pulsed-laser light could result from a combination of simultaneous and sequential two-photon excitation of CuPcS₄. The triplet state of CuPcS₄ absorbs around 532 nm,¹⁹ where the ground state absorbs weakly, suggesting that reactive, cytotoxic species most likely evolve from the higher triplet state T_n via a sequential mechanism (Figure II.8, path 2). Alternatively, simultaneous photon activation to the higher triplet state T_n could occur directly via intersystem crossing from the S_n state, through a virtual excited state S_i (Figure II.8, path 1).



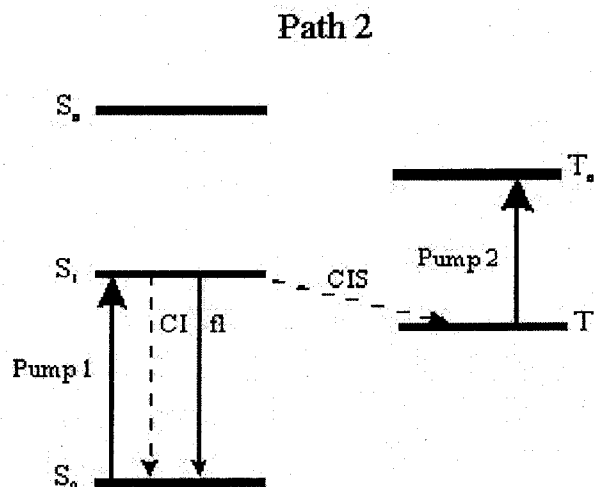


Figure II.8 Proposed pathways to populate the triplet excited T_n state of CuPcS₄; fl = fluorescence, ISC = intersystem crossing, IC = internal conversion.

Both pathways lead to damaging species via the higher T_n state, a mechanism referred to as Type III by Laustriat,⁴⁶ complementing the conventional photochemical Type I and Type II mechanism as defined by Foote.⁷ Most available data support the sequential mechanism as the predominant pathway. The very rapid internal conversion $S_2 \rightarrow S_1$ competes with the intersystem crossing $S_2 \rightarrow T_n$, and since the $^2S_2 \rightarrow ^2S_1$ transition occurs within the ~ 210 fs time resolution of the apparatus it is highly unlikely that any direct $^2S_2 \rightarrow T_n$ transition occurs under our experimental conditions.^{19,47} Also the lifetime of the higher excited state S_n for the Q electronic transition of the (CuPcS₄)⁻ anion has been estimated < 500 fs.³⁷ Combined these data strongly suggest that the intersystem crossing is practically impossible and that the principal pathway to populate the state T_n involves a $^2S_1 \rightarrow ^2T_1/{}^4T_1 \rightarrow T_n$ sequential two-photon, Type III mechanism.

The product formed from the excited state T_n most likely is the reduced (CuPcS₄)⁻ anion radical, characterized by its absorbance maximum at 580 nm.²⁷ This radical is conveniently produced by irradiating CuPcS₄ in a degassed, aqueous solution, with two pulsed photons at 623 nm and 500 nm, successively with a 10 μ s delay time. This species has a life time in the order of 10 ns, which is twice the estimated 5 ns life time of the triplet T_1 state.¹⁹ The radical is not detected upon irradiation of CuPcS₄ with continuous visible light of 656 nm.²⁷

Conclusion

In this study we show for the first time that CuPcS₄, i.e. a phthalocyanine containing a paramagnetic central metal ion incapable of generating singlet oxygen via a one-photon, Type II mechanism, can photo-inactivate Jurkat cells in vitro via a two-photon, Type III mechanism. The oxygen-independent nature of this mechanism provides the potential to use two-photon therapy for the photodynamic therapy of tumours containing hypoxic regions that do not respond to conventional radiation treatments. Recently Karotki et al.⁴⁸ showed that two-photon excitation of Photofrin in the near infrared region dominates over one-photon excitation and they suggest a potential application of two-photon PDT in age related macular degeneration (AMD). Full characterization of the reactive species involved in the two-photon activation of CuPcS₄ and the potential use of phthalocyanine-based, near IR two-photon therapy in AMD, are in progress in our laboratories.

Acknowledgements

Funding for this research was provided by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) (J. E. v. L.), the Canadian Institute for Photonics Innovations (D. H.) and by the Intelligent Materials and Systems Institute of the Université de Sherbrooke (D. H.).

References

- 1 T. J. Dougherty, Photosensitizers: therapy and detection of malignant tumors, *Photochem. Photobiol.*, 1987, 45, 879–889.
- 2 T. J. Dougherty, C. J. Gomer, B. W. Henderson, G. Jori, D. Kessel, M. Korbelik, J. Moan and Q. Peng, Photodynamic therapy, *J. Natl. Cancer Inst.*, 1998, 90, 889–905.
- 3 W. M. Sharman, C. M. Allen and J. E. van Lier, Photodynamic therapeutics: Basic principles and clinical applications, *Drug Discovery Today*, 1999, 4, 507–517.
- 4 D.E.J.G.J. Dolmans, D. Fukumura, R.K. Jain, Photodynamic therapy for cancer. *Nat. Rev. Cancer* 2003, 3, 380–387.
- 5 B. C. Wilson, Photodynamic therapy for cancer: Principles. *Can. J. Gastroenterology* 2002, 16, 393–396.

- 6 M. B. Vrouenraets, G.W.M. Visser, G.B. Snow, GAMS van Dongen, Basic principles applications in oncology and improved selectivity of photodynamic therapy, *Anticancer Res.*, 2003, 23, 505–522.
- 7 C. S. Foote, Definition of type I and type II photosensitized oxidation, *Photochem. Photobiol.*, 1991, 54, 659-664.
- 8 K. R. Weishaupt, C. J. Gomer and T. J. Dougherty, Identification of singlet oxygen as the cytotoxic agent in photo-inactivation of a murine tumor, *Cancer Res.*, 1976, 36, 2326–2329.
- 9 W. M. Sharman, C. M. Allen and J. E. van Lier, Role of activated oxygen species in photodynamic therapy, *Methods Enzymol.*, 2000, 319, 376–400.
- 10 I. Rosenthal, C. M. Krishna, P. Riesz and E. Ben-Hur, The role of molecular oxygen in the photodynamic effect of phthalocyanines, *Radiat. Res.*, 1986, 107, 136–142.
- 11 A. Andreoni, R. Cubeddu, S. De Silvestri, P. Laporta, and O. Svelto, Two-step laser activation of hematoporphyrin derivative, *Chem. Phys. Lett.*, 1982, 88, 37-39.
- 12 A. Andreoni, Two-step photoactivation of hematoporphyrin by excimer-pumped dye-laser pulses, *J. Photochem. Photobiol., B*, 1987, 1, 181-193.
- 13 E.N. Fluhler, J.K. Hurley and I.E. Kochevar, Laser intensity and wavelength dependence of Rose-Bengal-photosensitized inhibition of red blood cell acetylcholinesterase, *Biochim. Biophys. Acta*, 1989, 990, 269-275.
- 14 G. Smith, W. G. McGimpsey, M. Lynch, I. E. Kochevar and R. W. Redmond, An efficient oxygen independent two-Photon photosensitization mechanism, *Photochem. Photobiol.*, 1994, 59, 135-139.
- 15 D. Leupold and W. Freyer, Proposal of modified mechanisms for photodynamic therapy, *J. Photochem. Photobiol., B*, 1992, 12, 311-313.
- 16 J. C. Scaiano, , L. J. Johnston, W. G. McGimpsey and D. Weir, Photochemistry of organic reaction intermediates: novel reaction paths induced by two-photon laser excitation, *Acc. Chem. Res.*, 1988, 21, 22-29.
- 17 H. Stiel, K. Teuchner, A. Paul, W. freyer and D. Leupold, Two-photon excitation of alkaly-substituted magnesium phthalocyanine: Radical formation via higher excited states, *J. Photochem. Photbiol. A*, 1994, 80, 289-298.
- 18 C. Lambert, T. Sarna and T. G. Truscott, Rose Bengal radicals and their reactivity, *J. Chem. Soc. Fraday Trans.*, 1990, 86, 3879-3882.

- 19 M. Fournier, C. Pépin, D. Houde, R. Ouellet and J. E. van Lier, Ultrafast studies of the excited-state dynamics of copper and nickel phthalocyanine tetrasulfonates : Potentiel sensitizers for the two-photon photodynamic therapy of tumours, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2003, 2, 1-8.
- 20 B. Brozek-Pluska, I. Szymczyk, H. Abramczyk, Raman spectroscopy of phthalocyanines and their sulfonated derivatives, *J. mol. Struct.*, 2005, 744-747, 481-485.
- 21 J. H. Weber and D. H. Bush, Complexes derived from strong field ligands. XIX. Magnetic properties of transition metal derivatives of 4,4',4'',4'''-tetrasulfophthalocyanines, *Inorg. Chem.*, 1965, 4, 469-471.
- 22 H. Ali, R. Langlois, J. R Wagner, N. Brasseur, B. Paquette, and J. E. van Lier, Biological activities of phthalocyanines-X. Syntheses and analyses of sulfonated phthalocyanines, *Photochem. Photobiol.*, 1988, 47, 713-717.
- 23 S. Marengo, D. Houde, N. Brasseur, T.L. Nguyen, R. Ouellet, J.E. van Lier, Measure of the singlet oxygen yield generated from naphthalocyanine photosensitizers, *J. Chim. Phys. Phys.-Chim. Biol.*, 1994, 91, 1211-1219.
- 24 M. J. Steinbeck, A.U. Khan, and M.J. Karnovsky, Intracellular singlet oxygen generation by phagocytosing neutrophils in response to particles coated with a chemical trap, *J. Biol. Chem.*, 1992, 267, 13425-13433.
- 25 N. J. Turro, *Modern Molecular Photochemistry*, ed. Paperback, University Science Books, 1991, Sausalito, ch. 5, pp. 103-117.
- 26 Moore, G.E., Gerner, R.E. and Franklin, H.A., Culture of Normal Human Leukocytes. *The Journal of the Am. Med. Assoc.*, 1967, 199, 519-524.
- 27 Y. Kaneko, Y. Nishimura, T. Arai, H. Sakuragi, K. Tokumaru, D. Matsunaga, UV light and red light chemistry of metallophthalocyanine: Wavelength dependent photochemical reduction of tetrasodium salts of Zn(II) and Cu (II) tetrasulphonatophthalocyanines with amines, *J. Photochem. Photobiol., A*, 1995, 89, 37-44.
- 28 M. M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 1976, 72, 248-254.
- 29 N. Brasseur, R. Langlois, C. La Madeleine, R. Ouellet and J. E. van Lier, Receptor-mediated targeting of phthalocyanines to macrophages via covalent coupling to native or maleylated bovine serum albumin, *Photochem. Photobiol.*, 1999, 63, 345-352.

- 30 C. Allen, W. M. Sharman, C. La Madeleine, J. M. Weber, R. Langlois, R. Ouellet and J. E. van Lier, Photodynamic therapy: tumour-targeting with adenoviral proteins, *Photochem. Photobiol.*, 1999, 70, 512-523.
- 31 P. Urizzi, C. Allen, R. Langlois, R. Ouellet, C. La Madeleine and J. E. van Lier, Low-density lipoprotein-bound aluminium sulfophthalocyanine: targeting tumour cells for Photodynamic therapy, *J. Porphyrins phthalocyanines*, 2001, 5, 154-160.
- 32 Tada, H., Shiho, O., Kuroshima, K., Koyama, M., and Tsukamoto, K. An improved colorimetric assay for interleukin 2. *J. Immunol. Methods*, 1986, 93, 157-165.
- 33 T. Mosman, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods*, 1983, 65, 55-63.
- 34 N. Cauchon, H. Tian, R. Langlois, C. La Madeleine, S. Martin, H. Ali, D. Hunting, and J. E. van Lier, Structure-Photodynamic Activity Relationships of Substituted Zinc Trisulfophthalocyanines, *Bioconjugate chem.*, 2005, 16, 80-89.
- 35 L. Howe and J. Z. Zhang, The Effect of biological substrates on the ultrafast excited-state dynamics of zinc phthalocyanine tetrasulfonate in Solution, *Photochem. Photobiol.*, 1998, 67, 90-96.
- 36 J. E. van Lier, Phthalocyanines as sensitizers for PDT of cancer, *Photodynamic Therapy of Neoplastic disease*, David Kessel, CRC Press, 1990, vol. 1, ch. 17, pp. 279-290.
- 37 H. Abramczyk and I. Szymczyk, Aggregation of phthalocyanine derivatives in liquid solutions and human blood, *J. Mol. Liquids*, 2004, 110, 51-56.
- 38 W. J. Schutte, M. Sluyters-Rehbach, J. H. Sluyters, Aggregation of an octasubstituted phthalocyanine in dodecane solution, *J. Phys. Chem.*, 1993, 97, 6069-6073.
- 39 P. J. Camp, A. C. Jones, R. K. Neely and N. M. Speirs, Aggregation of Copper (II) Tetrasulfonated Phthalocyanine in Aqueous Salt Solutions, *J. Phys. Chem. A*, 2002, 106, 10725-10732.
- 40 R. Langlois, H. Ali, N. Brasseur, J. R. Wagner and J. E. van Lier, Biological activities of phthalocyanines-IV. Type II sensitized photooxidation of L-Tryptophan and cholesterol by sulfonated metallo phthalocyanines, *Photochem. Photobiol.*, 1986, 44, 117-123.
- 41 P. Maillard, P. Krausz and C. Giannotti, Photoinduced activation of molecular oxygen by various porphyrins, bis-porphyrins, phthalocyanines, pyridinoporphyrans, and their metal derivatives, *J. Organomet. Chem.*, 1980, 197, 285-290.

- 42 T. L. Freeman, S. E. Cope, M. R. Stringer, J. E. Cruse-Sawyer, S. B. Brown, D. N. Batchelder and K. Birbeck, Investigation of the subcellular localization of zinc phthalocyanines by raman mapping, *Appl. Spectrosc.*, 1998, 52, 1257-1263.
- 43 J. E. Cruse-Sawyer, Thesis, The University of Leeds, Leeds, 1996.
- 44 J. W. Winkelman and S. Kimel, The relationship between porphyrin transport and tissue uptake with photosensitization from 1O₂, *Photodynamic Therapy of Neoplastic disease*, David Kessel, CRC Press, 1990, vol. 2, ch. 3, pp. 30-39.
- 45 Y. Mir, D. Houde and J. E. van Lier, in preparation.
- 46 G. Laustriat, Molecular mechanisms of photosensitization, *Biochimie*, 1986, 68, 771-778.
- 47 A. V. Nikolaitchik and M. A. J. Rodgers, Crown ether substituted monomeric and cofacial dimeric metallophthalocyanines. 2. Photophysical studies of the cobalt(II) and nickel(II) variants, *J. Phys. Chem.*, 1999, 103, 7597-7605.
- 48 A. Karotki, M. Khurana, J. R. Lepock and B. C. Wilson, Simultaneous two-photon excitation of Photofrin in relation to photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.*, 2006, 82, 443-452.

CHAPITRE III. DEUXIÈME ARTICLE

Youssef Mir, Daniel Houde and Johan E. van Lier, Photodynamic inhibition of acetylcholinesterase following two-photon excitation of copper tetrasulfophthalocyanine, Lasers in Medical Science, 2008, 23, 19-25.

III.1. Buts

Ce travail de recherche a été fait dans le but d'évaluer la non-dépendance de la TPD à 2- γ à l'oxygène. Ainsi, à cause de la difficulté d'aboutir à un milieu cellulaire anoxique, même après un barbotage prolongé, l'ACE a été utilisée comme une entité biologique cible. Cette dernière représente une molécule de choix pour l'évaluation des Ps pour la TPD. La source biphotonique utilisée pour irradier l'ACE est constituée de deux sources laser continus (argon 514 et diode 670 nm).

III.2. Hypothèses

L'utilisation de deux sources laser continus permettrait la population sélective de l'état excité T_n par 2- γ séquentiels sans compétition d'absorption entre le deuxième photon (514 nm) et l'état fondamental S_0 . Par ailleurs, tout changement de l'activité de l'ACE pourrait servir comme indicateur de l'intégrité de la membrane plasmique.

Photodynamic inhibition of acetylcholinesterase following two-photon excitation of copper tetrasulfophthalocyanine

Youssef Mir, Daniel Houde* and Johan E. van Lier

Department of Nuclear Medicine and Radiobiology, Faculty of Medicine and Health Sciences, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, QC, Canada, J1H 5N4

Phone: (819) 346-1110 ext 14502

Fax: (819) 564-5442

*E-mail: Daniel.houde@usherbrooke.ca

Received: 7 November 2006 / Accepted: 26 December 2006 / Published online: 24

March 2007

Abstract

Sequential two-photon ($2-\gamma$) activated copper tetrasulfophthalocyanine (CuPcS_4) was shown capable of inactivating acetylcholinesterase (ACE). ACE activity was measured photometrically by the Ellman method. Simultaneous irradiation of ACE in the presence of CuPcS_4 with 514 nm (183 mW/cm^2) and 670 nm (86 mW/cm^2) continuous wave (CW) light induced a 20-50% increase in enzyme inhibition as compared to one-photon ($1-\gamma$) irradiation, using either 514 nm or 670 nm (CW) light at the same fluences. The enzyme activity was not affected by CuPcS_4 or light alone, decreased linearly with the irradiation time, and was shown to be oxygen-dependent. We conclude that the photoinactivation of ACE with sequential $2-\gamma$ irradiation involves reactive oxygen species produced by the interaction of the upper excited T_n state of CuPcS_4 with molecular oxygen. As CuPcS_4 shows little activity as a conventional $1-\gamma$ photosensitizer, unwanted side effects such as prolonged skin sensitivity are eliminated rendering $2-\gamma$ photodynamic therapy advantageous for the treatment of selected medical applications.

Key words: Laser; Photodynamic therapy; Phthalocyanine; Two-photon; Acetylcholinesterase

Abbreviations: PDT, photodynamic therapy; singlet oxygen, $^1\text{O}_2$; ACE, acetylcholinesterase; ROS, reactive oxygen species; Ps, photosensitizer; $1-\gamma$, one-photon; $2-\gamma$, two-photon; CW, continuous wave

Introduction

Photodynamic therapy (PDT) of cancer and several other medical conditions requires a photosensitizer (Ps), molecular oxygen, and light of an appropriate wavelength. After localization of the Ps in the target tissue, light is administered resulting in the production of various reactive oxygen species (ROS) that can induce cell death and vascular damage [1-3]. The photo-excited triplet Ps may react via a type I or a type II mechanism [4]. The type I mechanism involves hydrogen-atom abstraction or electrontransfer between the excited state of the sensitizer and a substrate to yield free radicals and radical ions that, in turn may react with molecular oxygen to give ROS. By contrast, a type II mechanism results from an energy transfer between the excited

state of the sensitizer and ground state molecular oxygen, generating the first excited state of oxygen, i.e., singlet oxygen ($^1\text{O}_2$). This zwitterionic species is extremely reactive and can interact with a large number of biological substrates to initiate oxidative chain reactions resulting in cell and tissue damage. Both mechanisms rely on the presence of oxygen, with the type II mechanism being the most widely accepted pathway in one-photon (1- γ) PDT leading to cell death [5-7]. This treatment has some side effects: The Ps used in clinic renders the skin and eyes sensitive to light [8-10]; for example hematoporphyrin derivatives (HpD) remain in the skin for as long as 1 month after treatment [11]. Thus, patients are advised to avoid direct sunlight and bright indoor light for at least 6 weeks after PDT [12]. In theory, these side effects can be circumvented via 2- γ activation and a Ps that is inactive as a 1- γ PDT agent. Two-photon (2- γ) PDT allows the Ps to reach a higher triplet excited state, capable of inflicting biological damage [13, 14]. Many studies have confirmed that a 2- γ mechanism leads to the production of toxic species including radicals that may induce chain reactions [15, 16], capable of inactivating enzymes [17, 18] and cells in vitro [18].

Recently, we found that sequential 2- γ excitation with 532-nm pulsed laser light of CuPcS₄ selectively populates the upper triplet excited T_n state leading to the production of cytotoxic species [19]. Among the latter we identified a reduced (CuPcS₄)^{•-} radical that is characterized by its absorbance maximum at 580 nm and a lifetime of 10 ns [20]. Since CuPcS₄ features a paramagnetic central metal ion resulting in limited capability to generate $^1\text{O}_2$ via a 1- γ mechanism, 2- γ activation of the latter could inflict direct biological damage to the photodynamic processes under anaerobic conditions. We subsequently showed that CuPcS₄ can photoinactivate Jurkat cells in vitro via a 2- γ activation (type III pathway) [19]. However, in cell culture a strict anaerobic environment is difficult to achieve. Even with prolonged nitrogen bubbling of degassed medium in a closed chamber, these conditions were not reached [21]. To evaluate the involvement of oxygen and the role of the upper triplet excited T_n state in the type III process we selected acetylcholinesterase (ACE) enzyme as a biological target. Using an enzyme rather than cell cultures now allowed us to work under complete anoxic conditions. Furthermore, changes in ACE activity have been shown to serve as a sensitive indicator of plasma membrane integrity [22], i.e., a critical target to inflict cell death [23]. Using phthalocyanines as Ps, we previously confirmed that membrane damage during PDT [24] leads to apoptosis via a cascade of events [25]. The efficacy of phthalocyanines as Ps for PDT relates to their strong absorption in

the far-red region of the spectrum ($\lambda \approx 680$ nm; $\epsilon = 10^5$ M⁻¹ cm⁻¹) where tissue transparency is optimal [26, 27]. Although various intracellular enzymes can be targeted by differently substituted metallo-phthalocyanine [28], the inactivation of ACE may be of pertinent physiological importance.

In this study, we used the absorption maximum of the transient T₁ state of CuPcS₄ (475-550 nm) to populate the T_n excited state of the Ps [29]. To this end we used two continuous wave (CW) light sources at 670 and 514 nm, which contrast the usual pulsed laser light sources reported for most 2- γ studies. Because the Ps ground state lacks a major absorption band at 514 nm, the two-colour laser system essentially induces sequential absorption of the 670- and 514-nm light to selectively excite the T₁ to the T_n state, without competitive absorption of the second photon by the ground state. Comparison between the ACE inhibition after 1- γ and 2- γ excitation was made and special attention was paid to the nature of toxic species produced from the upper excited state of CuPcS₄.

Materials and methods

Chemicals

CuPcS₄ was prepared via the condensation method adapted from Weber and Bush, as previously reported [29, 30]. Products used for enzymatic reactions were purchased from Sigma-Aldrich. The reaction mixture was prepared according to the method of Ellman et al. [31]: Phosphate buffer (0.1 M, pH = 7.0 and 8.0), acetylthiocholine iodide (0.075 M prepared in phosphate buffer at pH = 8.0), dithiobisnitrobenzoic acid (DTNB; 39.6 mg in 10 ml phosphate buffer pH = 7.0). ACE, Type XII-S, Bovine Erythrocytes was prepared at 1.27 mg/ml in phosphate buffer (pH = 8.0) with 1% of gelatine (Eastman Organic Chemicals). All solutions were kept refrigerated at 4°C until used.

Irradiation conditions

During irradiation, 0.5 ml of the ACE preparation (100 μ g/ml) containing CuPcS₄ (90 μ M) was placed in 1.5-ml quartz cell (0.5-cm light path) fitted with a Teflon stopper and stirred gently and continuously with a magnetic spinbar. Irradiation times were set at 15, 30, and 45 min. The laser spot was adjusted to ensure a uniform illumination of the cuvette front surface with a total illuminated area of ~ 2.35 cm². For anoxic experiments, nitrogen was blown gently over the

surface of the stirred sample for 30 min before and during irradiation. Dark control samples were treated in the same manner. The irradiation sources consisted of a fibre-coupled, 670-nm CW laser system (B&W TEK), set at 86 mW/cm^2 and a 514-nm Argon ion laser CW, 6 W (Coherent, Innova 90 model) set at 183 mW/cm^2 fitted with a 500FS80-25 filter to prevent excitation of the CuPcS_4 in the Soret band region (Figure III.1).

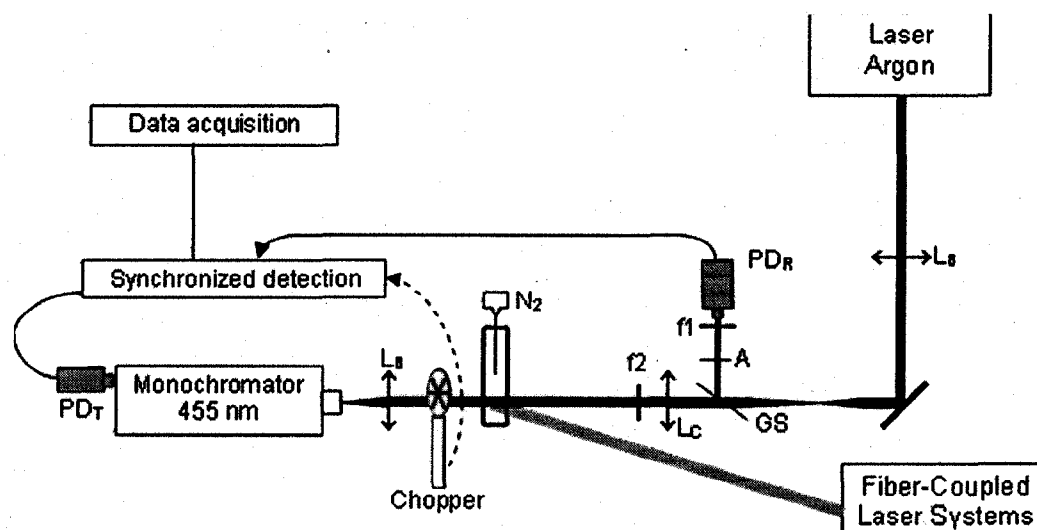


Figure III.1 The irradiation probe experimental setup. L_B Biconvex lens, L_C cylindrical lens, PD_T photodiode test, PD_R photodiode reference, N_2 nitrogen gas, GS glass slide, A attenuator, f filter, f1 450FS10-25, f2 500FS80-25. After irradiation with 514- and/or 670-nm CW light, f2 is replaced by two filters 3 (400FS70-25) and 4 (450FS40-25) to provide the 455-nm probe light to quantify TNB production. The two CW beams overlap and illuminate the entire quartz cell

Enzyme activity

ACE activity was assayed photometrically in four to six duplicates by the method of Ellman et al. [31]. Briefly, after irradiation, the ACE solution (0.5 ml) is mixed with 2670 μL phosphate buffer (pH=8) containing acetylthiocholine and DTNB to give final concentrations of 473.2 μM and 315.46 μM , respectively. The mixture is stirred and incubated at room temperature to allow hydrolysis of acetylthiocholine by ACE to give thiocholine. The latter reacts with DTNB to give TNB (thiobisnitrobenzoic acid), which is quantified by its absorption at 455 nm ($\epsilon=13,600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). The ACE activity is estimated both from the initial rate of TNB formation and after reaching a plateau, from the final TNB concentration. The early TNB formation is followed with

a probe light delivered by the Argon ion laser (fitted with two filters, 400FS70-25 and 450FS40-25). Figure III.1 shows the irradiation probe experimental setup. The transmitted light is directed through a chopper (Model SR540 chopper controller, Standard Research Systems) to the entrance of a 0.5-mm small monochromator (Jobin Yvon, Division instruments S.A.) to select 455-nm light only. The intensity of the output signal is detected with a silicon photodiode (UV-444BQ 185-1150 nm). A small sample of the Argon laser beam is diverted to another photodiode in order to compensate for intensity fluctuations. The signals are analysed by synchronized detection and collected by a computer using LabviewTM 6.1 software (National instruments) to calculate the TNB concentration every second. The initial TNB production rate is calculated from the slope of the TNB vs. time curve.

The TNB production reaches a plateau after ~ 10 min and the final TNB concentration is measured at 30 min by measuring its absorbance at 455 nm using a spectrophotometer (HITACHI, U-2000).

Results

Examples of the TNB production as a function of time, during the initial 0.15-1.2 min after addition of Ellman's reagent, are presented in Figure III.2. The initial TNB production rates are calculated from these curves. Figure III.3 shows two standard plots for the assessment of the ACE concentration in the presence of CuPcS₄ and absence of light. Plot 3A shows the ACE concentration as a function of the initial TNB production rate, while plot 3B shows the ACE concentration as a function of the maximum TNB concentration, i.e., measured after 30-min incubation. Both plots show a linear correlation between the TNB production rate or final concentration and the amount of active enzyme.

The effect of light in the presence of CuPcS₄ and air on the ACE activity is presented in Figure III.4. The ACE concentrations were estimated both from the initial TNB production rate (plot 4A) and the maximum amount of TNB produced (plot 4B). Single photon therapy with 514- or 670-nm CW laser light resulted in moderate loss of enzyme activity. In contrast, simultaneous CW irradiation with both light sources to induce 2- γ activation of the Ps resulted in a pronounced higher loss in ACE activity (Figure III.4). While the 2- γ treatment resulted in a linear decrease in ACE activity during the 15- to 45-min light exposure, the 1- γ treatment at 670

nm induced ACE destruction in a nonlinear manner (Figure III.4). The latter most likely reflects photobleaching of the CuPcS₄ monomer [19]. The non linearity of the combined effects of 1- γ treatments at 514 and 670 nm shows the dominant ACE inactivation induced by 1- γ treatment with 670-nm light (Figure III.5). Using the initial TNB production rate to calculate enzyme inactivation showed a larger effect than using the total TNB produced suggesting reversible enzyme damage.

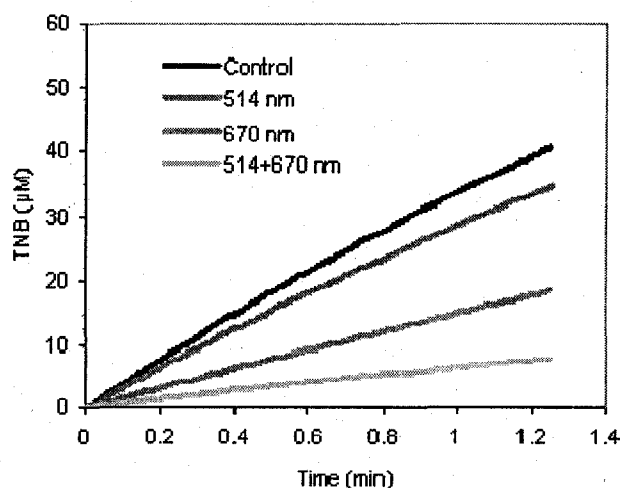
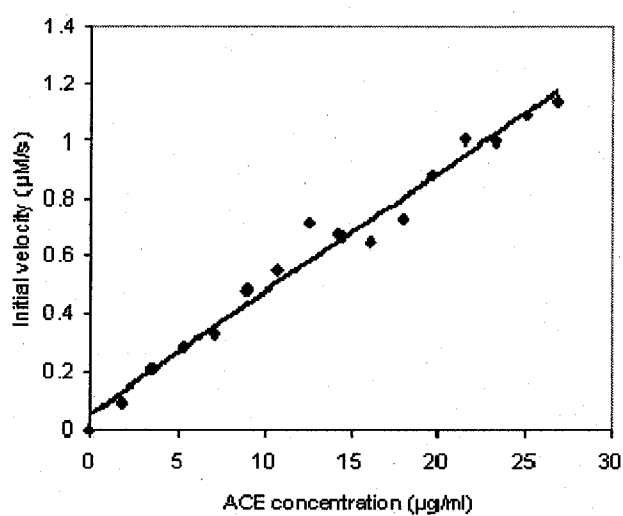


Figure III.2 TNB production using the Ellman procedure to estimate ACE activity. ACE in the presence of CuPcS₄ and air was exposed to 514- and 670-nm CW light either separately or simultaneously, for 45 min. The remaining ACE activity was measured by following the conversion of DTNB to TNB using the Ellman procedure. The TNB production curve over the initial 1.2 min was used to calculate the initial TNB production rate that, in turn, served as a parameter to estimate the ACE concentration

a)



b)

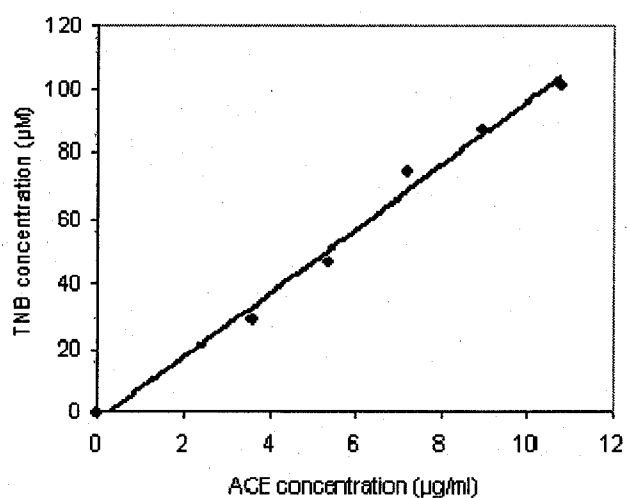
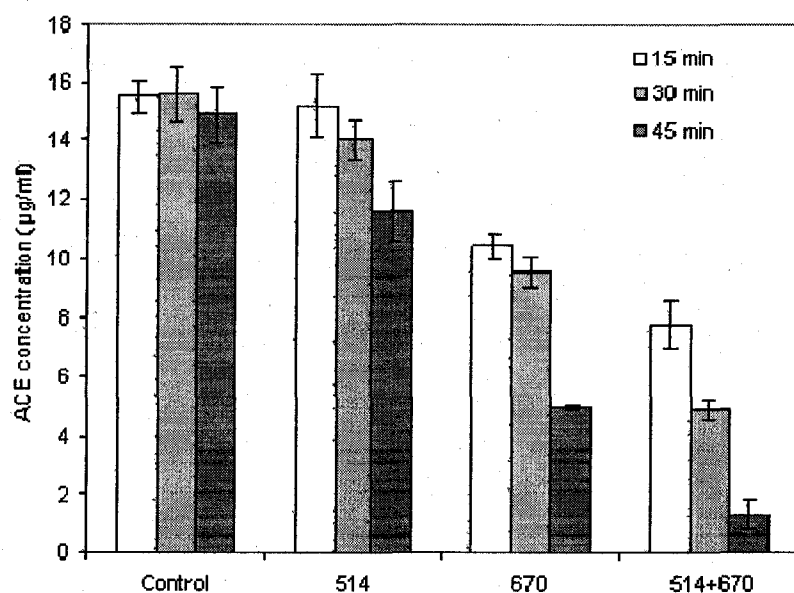


Figure II.3 Initial velocity of TNB production as a function of the ACE concentration. Different concentrations of ACE were incubated at room temperature, in the dark, with acetylthiocholine in the presence of CuPcS_4 and Ellman reagent. The TNB concentration was measured spectrophotometrically **a** during the first 20 s and **b** After 30 min of incubation at room temperature

a)



b)

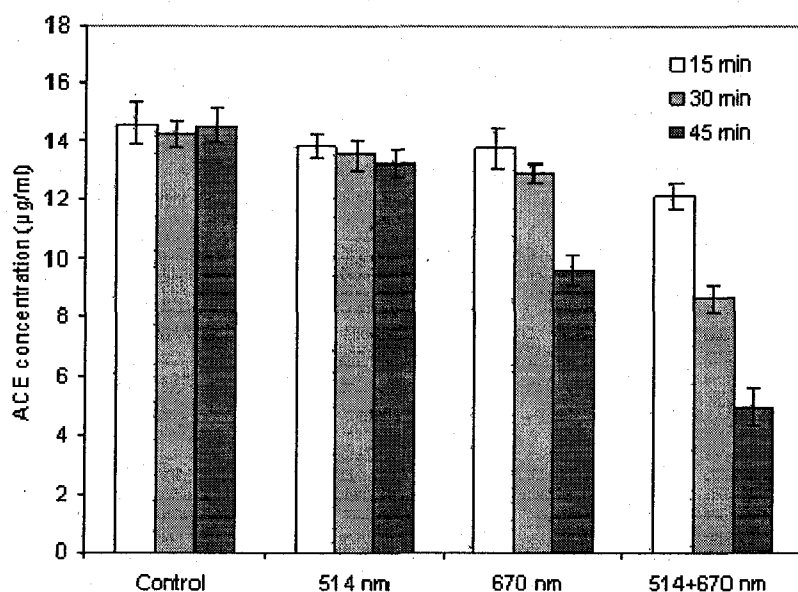
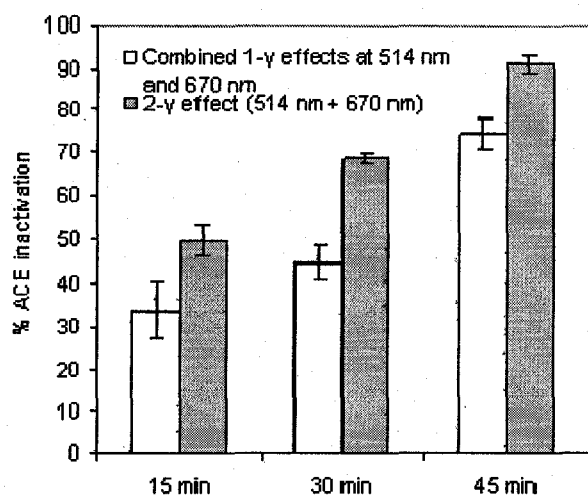


Figure III.4 The effect of 1- γ and 2- γ PDT on ACE activity. ACE in the presence of CuPcS_4 and air was exposed to 514- and 670-nm CW light either separately or simultaneously for different time periods. The ACE activity was subsequently measured by the Ellman procedure, **a** using the initial TNB production rate and **b** after 30 min using the total amount of TNB produced. Each data point represents the average of four to six different experiment and the error bars in the figures represent standard deviation of the mean

a)



b)

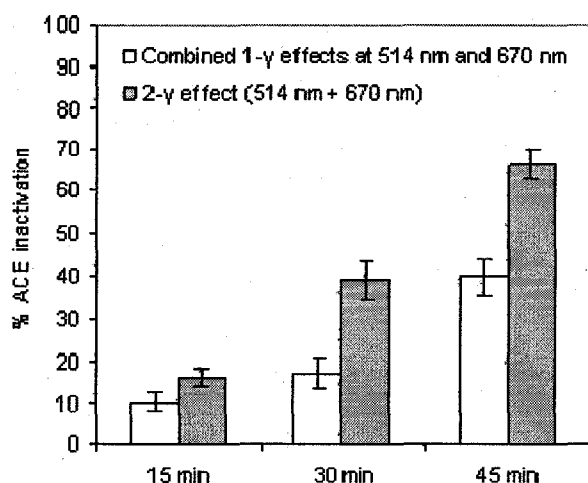


Figure III.5 Comparison of the ACE inactivation after 2- γ PDT and the combined 1- γ PDT effects with 514 and 670 nm, following different irradiation times, **a** using the initial TNB production rate and **b** using the total amount of TNB produced after 30 min of incubation at room temperature. Data were taken from Figure III.4a and 4b respectively

Discussion

In this study we show that ACE can be inactivated by the combined action of 514- and 670-nm CW light, CuPcS₄ as a Ps and air (Figure III.4). Incubation of ACE with CuPcS₄ (90 μ M) in the

dark had no effect on enzyme activity, in agreement with earlier observations that Cu^{++} ions, even at high ionic strength ($\leq 100 \mu\text{M}$), do not effect ACE activity [32]. Furthermore, 514- and 670-nm CW light, either alone or simultaneously, had no effect on ACE activity in the absence of Ps in aerated solutions, or in the presence of CuPcS_4 in degassed solution. Thus CuPcS_4 photoinactivation of ACE is oxygen-dependent, which is consistent with previous reports on pulsed 2- γ PDT of ACE with Rose Bengal (RB) as Ps [33].

In aerated medium containing CuPcS_4 , ACE activity decreases with increasing irradiation time (Figure III.4). Although the use of either standard curve (Figure III.3a or b) showed a similar effect on enzyme activity measurements, the percentage of inactivation appeared larger when the initial TNB production rate was used, suggesting reversible enzyme damage. The significance of the difference between the 1- γ and 2- γ protocols on ACE activity (Figure III.4) is even more evident when the individual 1- γ effects at 514 and 670 nm are combined and then compared with the enzyme inhibition induced by the 2- γ protocol (Figure III.5).

Using either procedure to calculate ACE activity, i.e., velocity of TNB production or total TNB, the 2- γ protocol induces a 20-50% higher ACE inhibition as can be predicted by adding the photodynamic effects of the individual 1- γ treatments. Simply adding the latter effects overestimates their potential contribution to ACE inhibition during the 2- γ treatment because it excludes population of the upper excited state (Figure III.6).

The mechanism responsible for the 1- γ inhibition is likely type I because no $^1\text{O}_2$ can be produced by CuPcS_4 with either 514- or 670-nm CW light [19]. The higher ACE inhibition observed with 670-nm light relates to the 670-nm absorption maximum of the CuPcS_4 monomer in physiological medium [19]. These results contrast previously reported photosensitized inhibition of ACE using RB as Ps, involving a predominant $^1\text{O}_2$ mechanism [33]. The sum of the 514 and 670-nm 1- γ inhibitions after irradiation is significantly less than the effect caused by combining 514- and 670-nm light (Figure III.5), suggesting the involvement of an alternative pathway. Transient absorption data suggest that the relative abundance of the T_1 vs S_0 states of CuPcS_4 during simultaneous irradiation with 514- and 670-nm light will be about 1:2 [29]. Because at 514 nm the molar extinction coefficient of the excited state T_1 is ~ 13 times greater than that of the S_0 ground state (2×10^4 vs $1.6 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, respectively, as estimated from published data [29]), we conclude that competition between the two species at this wavelength is

negligible. Thus, the 2- γ concept appears to be the most likely mechanism responsible for ACE inactivation during simultaneous irradiation with 514- and 670-nm light.

As the triplet state of CuPcS₄ absorbs between 500 and 550 nm [29], and the ground state absorbs around 670 nm, reactive, toxic species most likely evolve from the higher triplet state T_n produced via a sequential mechanism (Figure III.6). Although an oxygen-independent photodynamic effect is possible from the upper excited triplet state (mechanism type III) at high Ps concentrations or anoxic conditions, as proposed by Laustriat [34], and we previously suggested the involvement of a CuPcS₄⁻ radical species in 2- γ cell inhibition [19], the current ACE damage requires oxygen suggesting the involvement of ROS. It is unlikely that the CuPcS₄⁻ radical anion can inflict direct ACE damage because of two considerations. Firstly, the active site of this enzyme is buried deep inside the molecule, restricting substrates and products access [35], which limits delivery of CuPcS₄⁻ to the active site, particularly in view of its short life time (~10 ns). Secondly, the three-dimensional structure of ACE shows that the channel leading to the active site contains negative ionic charges that deter negatively charged species to be drawn inside [35-38]. However, our proposed oxygen-independent 2- γ PDT mechanism to explain cell death [19] remains a possibility warranting further investigation.

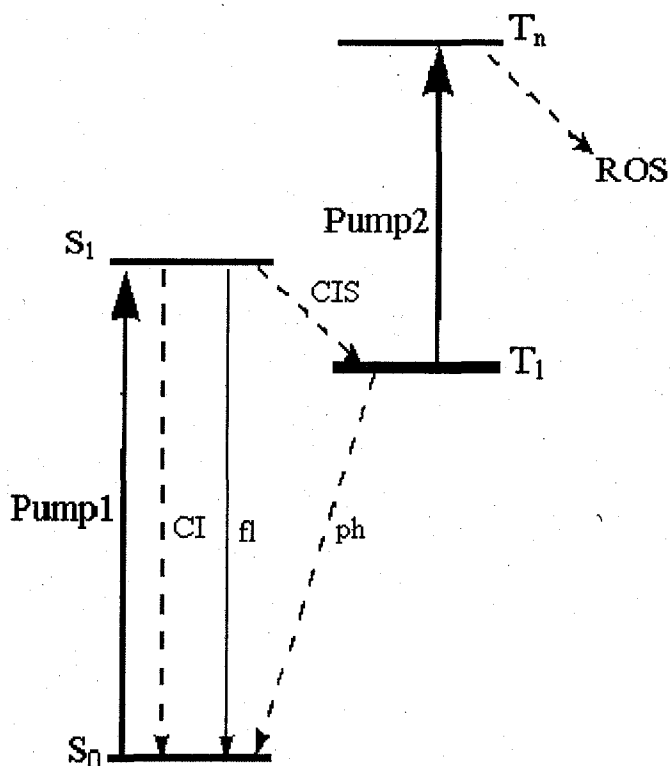


Figure III.6 Proposed pathways to produce ROS after population of the triplet excited T_n state of CuPcS₄ with sequential 2- γ , CW irradiation with 670- and 514-nm laser light; fl = fluorescence, ISC = intersystem crossing, IC = internal conversion, ph=phosphorescence

In conclusion, using two CW light sources, we were able to populate upper excited states of the Ps, similarly as previously accomplished with high-energy pulsed laser light [39]. Our findings show that 2- γ PDT with CuPcS₄ via the short-lived excited triplet T_1 state is an effective photodynamic process, requiring little energy to generate toxic species of biological importance. To better characterize these toxic species and to identify all parameter involved in the enzymatic reaction, we are currently studying the kinetics of ACE inhibition by numerical analysis of the hydrolysis time curves.

Acknowledgements

Funding for this research was provided by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR, grant no. MOP-37768; J.E.v.L.), the Canadian Institute for Photonics Innovations (D.H.) and by the Intelligent Materials and Systems Institute of the University of Sherbrooke (D.H.).

References

- 1 Dougherty TJ (1987) Photosensitizers: therapy and detection of malignant tumors. *Photochem Photobiol* 45:879–889
- 2 Dougherty TJ, Gomer CJ, Henderson BW, Jori G, Kessel D, Korblik M, Moan J, Peng Q (1998) Photodynamic therapy. *J Natl Cancer Inst* 90:889–905
- 3 Rosenthal I, Krishna CM, Riesz P, Ben-Hur E (1986) The role of molecular oxygen in the photodynamic effect of phthalocyanines. *Radiat Res* 107:136–142
- 4 Foote CS (1991) Definition of type I and type II photosensitized oxidation. *Photochem Photobiol* 54:659–664
- 5 Weishaupt KR, Gomer CJ, Dougherty TJ (1976) Identification of singlet oxygen as the cytotoxic agent in photo-inactivation of a murine tumor. *Cancer Res* 36:2326–2329
- 6 Sharman WM, Allen CM, van Lier JE (2000) Role of activated oxygen species in photodynamic therapy. *Methods Enzymol* 319:376–400
- 7 Sharman WM, Allen CM, van Lier JE (1999) Photodynamic therapeutics: Basic principles and clinical applications. *Drug Discov Today* 4:507–517
- 8 Dolmans DEJGJ, Fukumura D, Jain RK (2003) Photodynamic therapy for cancer. *Nat Rev Cancer* 3:380–387
- 9 Vrouenraets MB, Visser GWM, Snow GB, van Dongen GAMS (2003) Basic principles, applications in oncology and improved selectivity of photodynamic therapy. *Anticancer Res* 23:505–522
- 10 Capella MAM, Capella LS (2003) A light in multidrug resistance: Photodynamic treatment of multidrug-resistant tumors. *J Biomed Sci* 10:361–366
- 11 Hayata Y, Konaka C (1990) Photodynamic therapy of neoplastic disease. In: David Kessel (ed) *Photodynamic Therapy of Neoplastic disease*, vol 1, CRC, Boca Raton, FL, pp 44–63
- 12 Freeman TL, Cope SE, Stringer MR, Cruse-Sawyer JE, Brown SB, Batchelder DN, Birbeck K (1998) Investigation of the subcellular localization of zinc phthalocyanines by raman mapping. *Appl Spectrosc* 52:1257–1263
- 13 Andreoni A, Cubeddu R, De Silvestri S, Laporta P, Svelto O (1982) Two-step laser activation of hematoporphyrin derivative. *Chem Phys Lett* 88:37–39
- 14 Andreoni A (1987) Two-step photoactivation of hematoporphyrin by excimer-pumped dye-laser pulses. *J Photochem Photobiol B: Biology* 1:181–193

- 15 Leupold D, Freyer W (1992) Proposal of modified mechanisms for photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B: Biology* 12:311-313
- 16 Stiel H, Teuchner K, Paul A, Freyer W, Leupold D (1994) Two-photon excitation of alkyl-substituted magnesium phthalocyanine: Radical formation via higher excited states. *J Photochem Photobiol A: Chemistry* 80:289-298
- 17 Fluhler EN, Hurley JK, Kochevar IE (1989) Laser intensity and wavelength dependence of Rose-Bengal-photosensitized inhibition of red blood cell acetylcholinesterase. *Biochim Biophys Acta* 990:269-275
- 18 Smith G, McGimpsey WG, Lynch M, Kochevar IE, Redmond RW (1994) An efficient oxygen independent two-photon photosensitization mechanism. *Photochem Photobiol* 59:135-139
- 19 Mir Y, Houde D, van Lier JE (2006) Two-photon absorption of copper tetrasulfophthalocyanine induces phototoxicity towards Jurkat cells in vitro. *Photochem Photobiol sci*, 5:1024-1030
- 20 Kaneko Y, Nishimura Y, Arai T, Sakuragi H, tokumaru K, Matsunaga D (1995) UV light and red light chemistry of metallophthalocyanine: Wavelength dependent photochemical reduction of tetrasodium salts of Zn(II) and Cu (II) tetrasulphonatophthalocyanines with amines. *J Photochem Photobiol A: Chem* 89:37-44
- 21 Lee See K, Forbes IJ, Betts WH (1984) Oxygen dependency of photocytotoxicity with haematoporphyrin derivative. *Photochem Photobiol* 39:631-634
- 22 Halbhauer KJ, Lemke C, Stibenz D, Linss W (1984) Activation of acetylcholine esterase (ACHE) as a sign of erythrocyte membrane alteration. *Exp Pathol* 25:35-44
- 23 Valenzano DP (1987) Photomodification of biological membranes with emphasis on singlet oxygen mechanisms. *Photochem Photobiol* 46:147-160
- 24 Cauchon N, Nader M, Bkaily G, van Lier JE, Hunting D (2006) Photodynamic activity of substituted zinc trisulfophthalocyanines: role of plasma membrane damage. doi: 10.1562/2005-12-13-RA-752
- 25 Cauchon N, Langlois R, Rousseau JA, Tessier G, Cadorette J, Lecompte R, Hunting DJ, Pavan RA, Zeisler SK, van Lier JE (2006) PET imaging of apoptosis with ⁶⁴Cu-labeled streptavidin following pretargeting of phosphatidylserine with biotinylated annexin-V. DOI 10.1007/s00259-006-0199-y

- 26 van Lier JE (1990) Phthalocyanines as sensitizers for PDT of cancer. In: David Kessel (ed) Photodynamic Therapy of Neoplastic disease, CRC Press, Boca Raton, Florida, 1:279-290
- 27 Allen CM, Sharman WM, van Lier JE (2001) Current status of phthalocyanines in the photodynamic therapy of cancer. *J Porphyrins Phthalocyanines* 5:161-169
- 28 Gantchev TG, van Lier JE (1995) Catalase inactivation following photosensitization with tetrasulfonated metallophthalocyanines. *Photochem Photobiol* 62:123-134
- 29 Fournier M, Pépin C, Houde D, Ouellet R, van Lier JE (2003) Ultrafast studies of the excited-state dynamics of copper and nickel phthalocyanine tetrasulfonates : Potentiel sensitizers for the two-photon photodynamic therapy of tumours. *Photochem Photobiol Sci* 2:1-8
- 30 Weber JH, Bush DH (1965) Complexes derived from strong field ligands XIX. Magnetic properties of transition metal derivatives of 4,4',4'',4'''-tetrasulfophthalocyanines. *Inorg Chem* 4:469-471
- 31 Ellman GL, Courtney KD, Andres Jr. V, Featherstone RM (1961) A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 7:88-95
- 32 Tomlinson G, Mutus B, McLennan I (1981) Activation and inactivation of acetylcholinesterase by metal ions. *Can J Biochem* 59:728-735.
- 33 Lambert CR, Stiel H, Leupold D, Lynch MC, Kochevar IE (1996) Intensity-dependent enzyme photosensitization using 532 nm nanosecond laser pulses. *Photochem Photobiol* 63:154-160
- 34 Laustriat G (1986) Molecular mechanisms of photosensitization. *Biochimie* 68:771-778
- 35 Tōugu V (2001) Acetylcholinesterase: mechanism of Catalysis and Inhibition. *Curr Med Chem* 1:155-170
- 36 Tan RC, Truong TN, McCammon JA, Sussman JL (1993) Acetylcholinesterase: electrostatic steering increases the rate of ligand binding. *Biochemistry* 32:401-403
- 37 Ripoll DR, Faerman CH, Axelsen PH, Silman I, Sussman JL (1993) An electrostatic mechanism for substrate guidance down the aromatic gorge of acetylcholinesterase. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:5128-5132
- 38 Gilson MK, Straatsma TP, McCammon JA, Ripoll DR, Faerman CH, Axelsen PH, Silman I, Sussman JL (1994) Open "Back Door" in a molecular dynamics simulation of acetylcholinesterase. *Science* 263:1276-1278

39 Scaiano JC, Johnston LJ, McGimpsey WG, Weir D (1988) Photochemistry of organic reaction intermediates: novel reaction paths induced by two-photon laser excitation. *Acc Chem Res* 21:22-29

CHAPITRE VI. TROISIÈME ARTICLE

Youssef Mir, Johan E. van Lier, Benoit Paquette and Daniel Houde, Oxygen Dependence of Two-photon Activation of Zinc and Copper Phthalocyanine Tetrasulfonate in Jurkat Cells, Photochemistry and Photobiology, 2008, 84, 1182-1186.

IV.1. Buts

Le but de ce travail est d'évaluer l'implication de l'oxygène dans la mortalité cellulaire après la TPD à 2- γ . Pour cela, une nouvelle méthode a été développée. Celle-ci permettra de manipuler des cellules dans un environnement strictement anoxique tout en contrôlant la pO_2 . La quantité de 1O_2 et la survie cellulaire ont été mesurées à différent pO_2 . Les sources utilisées sont monophotonique (670 nm continus) et biphotonique (532 nm pulsés). Les deux sources ont été combinées pour augmenter la probabilité de peuplement de l'état T_n . Les Ps étudiés, CuPcS₄ et ZnPcS₄, ont une photophysique comparable, mais leur capacité à produire 1O_2 est différente.

IV.2. Hypothèses

La corrélation entre la production de 1O_2 et la survie cellulaire à différent pO_2 , après la TPD à un et 2- γ , pourrait éclaircir la dépendance du mécanisme de type III à l'oxygène. Par ailleurs, cette dépendance à différents pO_2 donnerait la limite (en terme de niveau d'oxygène) pour laquelle les deux Ps sont efficaces à un et/ou à 2- γ . De plus, cette étude permettrait de faire la différence entre les deux Ps en termes d'efficacité à différents pO_2 .

Oxygen Dependence of Two-photon Activation of Zinc and Copper Phthalocyanine Tetrasulfonate in Jurkat Cells

Youssef Mir, Johan E. van Lier, Benoit Paquette and Daniel Houde*

**Department of Nuclear Medicine and Radiobiology, Faculty of Medicine and
Health Sciences, Université de Sherbrooke, QC, Canada, J1H 5N4**

***Corresponding author: Daniel Houde, Department of nuclear medicine and
radiobiology, Faculty of medicine and health sciences, Université de Sherbrooke,
3001, 12th Avenue North, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4; Tel.: 819-346-
1110, ext. 14502; FAX: 819-564-5442; Daniel.Houde@usherbrooke.ca**

**Received 10 October 2007, accepted 7 January 2008
Published online: 7 March 2008**

Abstract

Photodynamic therapy (PDT), the use of light-activated drugs, is a promising treatment of cancer as well as several non-malignant conditions. However, the efficacy of one-photon ($1-\gamma$) PDT is limited by hypoxia, which can prevent the production of the cytotoxic singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) species, leading to tumor resistance to PDT. To solve this problem, we have proposed an irradiation protocol based on a simultaneous, two photons ($2-\gamma$) excitation of the photosensitizer (Ps). Excitation of the Ps triplet state leads to an upper excited triplet state T_n with distinct photochemical properties, which could inflict biological damage independent of the presence of molecular oxygen. To determine the potential of a $2-\gamma$ excitation process, Jurkat cells were incubated with zinc or copper phthalocyanine tetrasulfonate (ZnPcS_4 or CuPcS_4). The ZnPcS_4 is a potent $^1\text{O}_2$ generator in $1-\gamma$ PDT, while the CuPcS_4 is inactive under these conditions. Jurkat cells incubated with either the ZnPcS_4 or CuPcS_4 were exposed to a 670 nm continuous-laser ($1-\gamma$ PDT), 532 nm pulsed-laser light ($2-\gamma$ PDT), or a combination of 532 nm and 670 nm ($2-\gamma$ PDT). The efficacy of ZnPcS_4 to photoinactivate the Jurkat cells decreased as the concentration of oxygen decreased for both the $1-\gamma$ and $2-\gamma$ protocol. In the case of the CuPcS_4 , the cell phototoxicity was measured only following the $2-\gamma$ irradiation, and its efficacy also decreased at lower oxygen concentration. Our results suggest that for CuPcS_4 the T_n excited state can be populated after $2-\gamma$ irradiation at 532 nm or the combination of 532 nm and 670 nm light. Dependency of phototoxicity upon aerobic conditions for both $1-\gamma$ and $2-\gamma$ PDT suggests that reactive oxygen species play an important role in $1-\gamma$ and $2-\gamma$ PDT.

Introduction

Photodynamic therapy (PDT) is used in clinic to treat malignant tumors and other diseases such as age-related macular degeneration (1). The photodynamic effect is obtained when a photosensitizer (Ps) accumulated in the target tissue is excited with visible-light at the appropriated wavelength, in presence of molecular oxygen, to yield reactive oxygen species (ROS). The latter can induce cell death via necrosis or apoptosis, as well as vascular damage (2-4). The photo-excited triplet state of the Ps can react via a type I or a type II mechanism (5). Both

mechanisms ultimately involve the interaction either indirectly (type I) or directly (type II) of molecular oxygen with the photoexcited Ps to produce ROS. The type II mechanism, mediated by singlet oxygen ($^1\text{O}_2$), is the most widely accepted pathway in one photon (1- γ) PDT leading to cell death (6).

The necessity for molecular oxygen in either pathway can greatly limit the efficacy of PDT in solid tumours where important hypoxic regions may exist (3). In theory, this lack of molecular oxygen can be circumvented via a two-photon (2- γ , type III mechanism) activation of the Ps in the Q band region. This allows the Ps to reach a higher triplet excited state, capable of inflicting biological damage in the absence of molecular oxygen (7, 8). Many studies have confirmed that a 2- γ mechanism leads to the production of toxic species including radicals that may induce chain reactions (9, 10), capable of inactivating enzymes (11, 12) and induced cell death in vitro (12). Previously, we have investigated as a Ps for 2- γ activation copper phthalocyanine tetrasulfonate (CuPcS_4). Due to paramagnetic features of central metal ion, this Ps has shown a limited (13) or no capability (4) to generate $^1\text{O}_2$ via a 1- γ mechanism.

Most available data support the sequential mechanism as the predominant pathway to populate the T_n state. The very rapid internal conversion $S_2 \rightarrow S_1$ competes with the intersystem crossing $S_2 \rightarrow T_n$, and since the $^2S_2 \rightarrow ^2S_1$ transition (for CuPcS_4) occurs within the ~ 210 fs time resolution of the apparatus it is highly unlikely that any direct $^2S_2 \rightarrow T_n$ transition occurs under our experimental conditions (14). Also the lifetime of the higher excited state S_n for the Q electronic transition of the $(\text{CuPcS}_4)^-$ anion has been estimated < 500 fs. Combined these data strongly suggest that the intersystem crossing is practically impossible and that the principal pathway to populate the state T_n involves a $^2S_1 \rightarrow ^2T_1/^4T_1 \rightarrow T_n$ sequential 2- γ , type III mechanism (15).

Further, we recently found that simultaneous 514 and 670 nm continuous laser light (16) of CuPcS_4 selectively populates the upper triplet excited T_n state leading to the production of toxic species. Among the latter we identified a reduced $\text{CuPcS}_4^{\bullet-}$ radical that is characterized by its absorbance maximum at 580 nm and a life time of 10 ns (17). We subsequently showed that CuPcS_4 can photo-inactivate Jurkat cells and acetylcholinesterase enzyme (ACE) in vitro via a 2- γ activation (15, 16). For ACE damage measured, we have observed the requirement of oxygen, which implies the involvement of ROS. Thus we have suggested that the $\text{CuPcS}_4^{\bullet-}$ radical anion cannot inflict direct ACE damage because of some considerations relying to the ACE structure

and the lifetime of $\text{CuPcS}_4^{\bullet -}$ radical. We concluded that an oxygen-independent 2- γ PDT mechanism leading to cell death remains a possibility warranting further investigation.

In order to evaluate the involvement of oxygen and the role of the upper triplet excited T_n state in the type III process we have developed a method that allowed us to manipulate cells under a strict anaerobic environment and at a defined oxygen partial pressure ($p\text{O}_2$). As control to assess the efficacy of the 2- γ process, CuPcS_4 is compared to the ZnPcS_4 . Their photophysical behaviours are similar (17). However, ZnPcS_4 is a much more effective 1- γ PDT agent than CuPcS_4 . Therefore, we expect that in the presence of molecular oxygen 1- γ PDT will lead to a cell death only with the ZnPcS_4 , while in hypoxic condition a 2- γ PDT will be effective with both Ps.

In this study, we used the absorption maximum of the ground state of both monomer Ps at ~ 670 nm and their transient T_1 state at a range of 475-550 nm to populate the T_n excited state of the Ps (14, 17). To this end we have used 532 nm pulsed-laser or 670 nm continuous-laser light at different $p\text{O}_2$ to evaluate the PDT effect of either 2- γ or 1- γ excitation, respectively. We have, eventually, combined both light sources to improve the population of the T_n excited state of the Ps, as done previously with two continuous laser light sources (16).

Materials and methods

Photosensitizer

ZnPcS_4 was prepared via condensation of sulfonated precursors and purified by extensive C-18 reversed-phase HPLC fractionation (Waters Corp.; Column: RCM 8 \times 10, Millipore), using a linear gradient from 100% aqueous 5.0 mM phosphate buffer (pH=5) to 100% methanol over 30 min (1.5 ml min^{-1}) (18, 19). CuPcS_4 was prepared via the condensation method adapted from Weber and Bush (19), as previously reported (14).

Both Ps were dissolved in phosphate buffer saline (PBS, pH=7.4) at a defined concentration, sterile filtered over a $0.22 \mu\text{m}$ filter and stored in the dark at 4°C .

Anaerobic condition

Degassed medium was achieved using a quartz anaerobic cuvette (Type 71, UV quartz, 10 mm Light path, Bubble forming anaerobic cell, 2 windows polished) purchased from NSG Precision Cells, Inc. The diagram and the description of this cuvette is detailed by Hodgson et al. (20). This cuvette was designed for enzymatic reaction purpose and we have adapted it to our study. Briefly, the height of the complete assembly is 10 cm and constituted with simple cuvette and a hollow stopper. The stream of N_2 enters the cuvette through the side arm and is conducted, through a groove in the male member of the ground joint, to the gassing tube. After rising through the liquid phase, the gas escapes through a hole in the male member of the joint, which connects, with a groove in the female member of the ground joint. A slight angular displacement of the hollow stopper simultaneously seals both the gas inlet and the gas outlet. In all experiments, N_2 was pre-purified from any contamination by passage over a $0.22\ \mu\text{m}$ filter. Nitrogen was conducted inside the cuvette at a pressure of 0.67 psi (Digital Pressure Transducer, Traceable®, ISO 17025, VWR International) and a flux of $6.2\ \text{ml min}^{-1}$ (Flowmeter, Plain ends, 65 mm, Bel-Art Products, VWR International). The pO_2 was measured by isolated dissolved oxygen meter and oxygen electrode (ISO_2), World Precision Instruments, Inc. continuously with purging the cuvette with N_2 . For this purpose, and to insure the same purging process, the hollow stopper was cut, and the cuvette was closed with a parafilm. During purging with N_2 the electrode of ISO_2 was introduced and pO_2 measured. Figure IV.1 demonstrates that 15 min of gassing accomplished the complete elimination of O_2 , which is similar to previous result (20) using an enzymatic reaction rate as a method to quantify the presence of O_2 . The cuvette, once having been gassed with N_2 and sealed, was able to exclude atmospheric O_2 for long periods. Thus, the interval of time between sealing and tipping-in could be extended to 12 h without noticeable entry of oxygen (20).

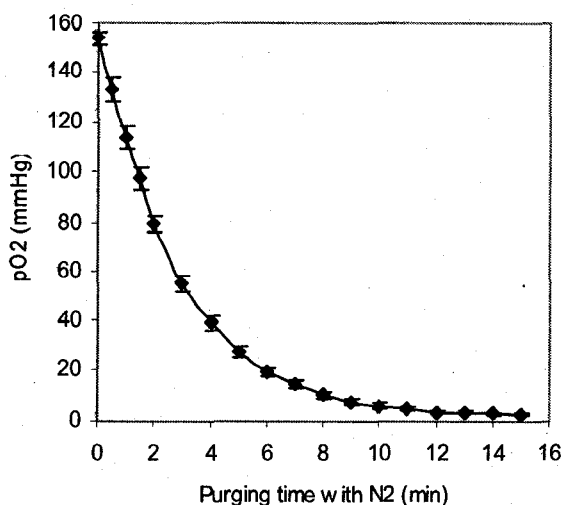


Figure IV.1. Elimination of O₂ as function of time purging with N₂. The pO₂ was measured by ISO₂ continuously with purging 2 ml of PBS in the anaerobic cuvette with N₂. Each data point represents the average of at least ten different experiments and the error bars in the figure represent standard deviation of the mean.

Singlet oxygen measurement

After 1- γ excitation ¹O₂ concentrations were measured in DMF using 9,10-diphenylanthracene (DPA, Aldrich) as a chemical trap (21). This measurement proceeded at different pO₂ using the anaerobic cuvette. Briefly, 2 ml of 4 μ M ZnPcS₄ in DMF, containing 85 μ M of DPA, was placed in the cuvette. After gassing with N₂ and being sealed, the cuvette was irradiated with a fibre-coupled, 670 nm, c.w. laser system, set at 280 mW (B&W TEK). The beam diameter was set at 1 cm and the irradiation time at 2 min (total dose = 43 J cm⁻²). The sample was stirred gently and continuously during bubbling and irradiation with a magnetic spin bar (8/0.5 mm, VWR International). Upon oxidation DPA is converted to the stable 9,10-diphenylanthracene endoperoxide (DAP), lacking the absorbance at 395 nm, and the loss of DPA is directly proportional to the amount of ¹O₂ produced (22). DPA concentrations were monitored before and after irradiation by the intensity of their absorption maxima at 395 nm, measured with a spectrophotometer (HITACHI, U-2000). The amount of ¹O₂ was calculated using change in absorbance and an extinction coefficient for DPA at 395 nm of 12389 M⁻¹ cm⁻¹ (23). The experiments were repeated at least ten times.

Cell culture and incubation conditions

Human T-lymphocytes (Jurkat cells: clone E6-1, human acute T-cell leukaemia, ATCC) were cultivated in 75 ml-flasks in 20 ml growth medium (24) (RPMI-1640 containing L-glutamine (Sigma) supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% penicillin streptomycin). Cells were maintained at 37°C under 5% CO₂ and seeded in fresh medium every 2-3 days. Cell concentrations were kept between 10⁵-10⁶ viable cells ml⁻¹, counted before each experiment.

Irradiation conditions

Fresh growth medium (30 ml) containing approximately 5x10⁵ cells ml⁻¹ were seeded in 75 cm² culture flasks, fortified with ZnPcS₄ or CuPcS₄ (10 µM) and incubated for 24 h at 37°C under 5% CO₂. At the end of the incubation period, the medium was removed and the cells were washed twice with PBS, re-suspended in PBS and counted. Two ml of PBS were placed in the cuvette and 50 µl of the cell suspension (2.05x10⁶ cells ml⁻¹) were placed in the hollow stopper, which allows 1x10⁶ cells ml⁻¹ of final concentration of cell to be irradiated. The cuvette was then assembled and gassed with N₂ before being sealed. The irradiation was started by tipping and thus rinsing the cell suspension from the hollow stopper into the body of the cuvette. During bubbling with N₂ and irradiation, the sample was stirred gently and continuously with a magnetic spin bar (8/0.5 mm, VWR International). For 1-γ activation of Ps the cuvette was irradiated with a fibre-coupled, 670 nm, c.w. laser system, set at 280 mW (B&W TEK). Dark control cells were prepared in the same manner. For 2-γ excitation of Ps the cuvette was irradiated with 532 nm pulsed laser light (10Hz, 8 ns pulse-width) delivered by a Nd:YAG laser (Lumonics). For both illumination methods, the beam diameter of laser light was set at 1 cm and the irradiation time at 15 min (total dose = 320 J cm⁻²). Cell survival was measured by the Trypan Blue exclusion test and the experiments were repeated at least ten times.

Trypan Blue Exclusion assay

This test was conducted accordingly to the product information sheet, catalogue 07050, Stemcell Technologies Inc. Cells were diluted 1:1 in 0.4% Trypan blue (Sigma) in PBS. After incubation for 5-15 min, non-viable cells were counted by a Neubauer hemacytometer, only non-viable cells will be stained with the Trypan blue dye.

Results

Singlet oxygen production

The $^1\text{O}_2$ production by ZnPcS_4 as a function of the O_2 partial pressure was assessed following 1- γ irradiation at 670 nm (Figure IV.2). As the concentration of molecular oxygen ($p\text{O}_2$) decreased, a constant reduction of $^1\text{O}_2$ production was measured until a $p\text{O}_2$ of ~ 20 mmHg, below which no $^1\text{O}_2$ was produced by ZnPcS_4 .

In the case of CuPcS_4 , it has been reported that no $^1\text{O}_2$ is produced during 1- γ irradiation (4). Our assay confirms that CuPcS_4 is a poor $^1\text{O}_2$ generator following 1- γ irradiation, and also when irradiated with 2- γ . Conversely, ZnPcS_4 was more potent under both 1- γ and 2- γ irradiation (Table IV.1). It is noteworthy that the most efficient pathway for generating $^1\text{O}_2$ with ZnPcS_4 was obtained with 1- γ irradiation at 670 nm.

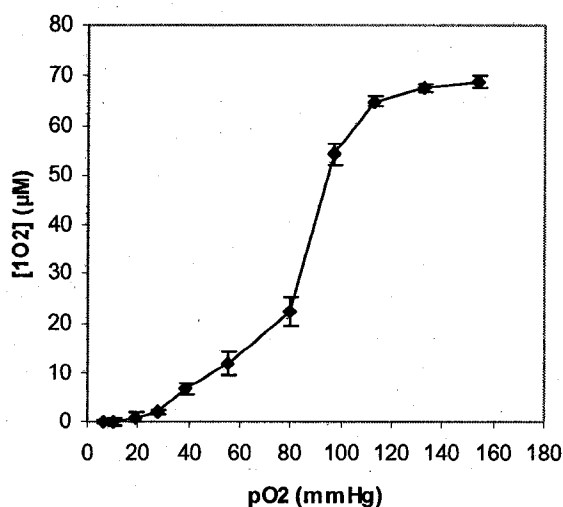


Figure IV.2. Singlet oxygen concentration formed by 4 μM of ZnPcS_4 in DMF at different $p\text{O}_2$. Each data point represents the average of at least ten different experiments and the error bars in the figures represent standard deviation of the mean.

Table IV.1 Singlet oxygen production by CuPcS₄ and ZnPcS₄ after different irradiation protocols

Ps	Wavelength (nm)	¹ O ₂ (μM/photon×cm ²) ×10 ²⁰
CuPcS ₄	1-γ at 670	0.104
	2-γ at 532	0
ZnPcS ₄	1-γ at 670	3.730
	2-γ at 532	1.142

Photoinactivation of Jurkat cells

The ability of ZnPcS₄ or CuPcS₄ to induce a cytotoxicity to the Jurkat cells was determined under various oxygen concentration from 2.7 to 160 mmHg. Cells were either irradiated with 1-γ continuous (670 nm), a 2-γ pulsed irradiation (532 nm), or a 2-γ dual irradiation (532 nm and 670 nm).

1-γ continuous 670 nm photon. Under our experimental condition, reduction of pO₂ from 160 to 2.7 mmHg by purging N₂ did not affect the cell viability of the non-irradiated cells (Figure IV.3a and 3b). Conversely, 1-γ irradiation at 670 nm of Jurkat cells incubated with ZnPcS₄ resulted significant cytotoxicity under normal oxygen concentration (pO₂ = 160 mmHg) with more than 95% of cell death. Survival of the Jurkat cells gradually increased as the pO₂ decreased. At the lowest pO₂ tested, 2.7 mmHg, the resulting cell survival was not significantly different than that of the control cells not incubated with the ZnPcS₄ ($P = 0.42$).

The cell survival assay was then repeated with the CuPcS₄ which is a poor ¹O₂ generator compared to ZnPcS₄. Our data showed that the irradiation of Jurkat cells with 1-γ at 670 nm did not induce any cytotoxicity at all the pO₂ tested.

The results of cell survival with Jurkat cells irradiated with 1-γ at 670 nm confirm that the cytotoxicity under these experimental conditions are largely related to the production of ¹O₂ following the type II pathway.

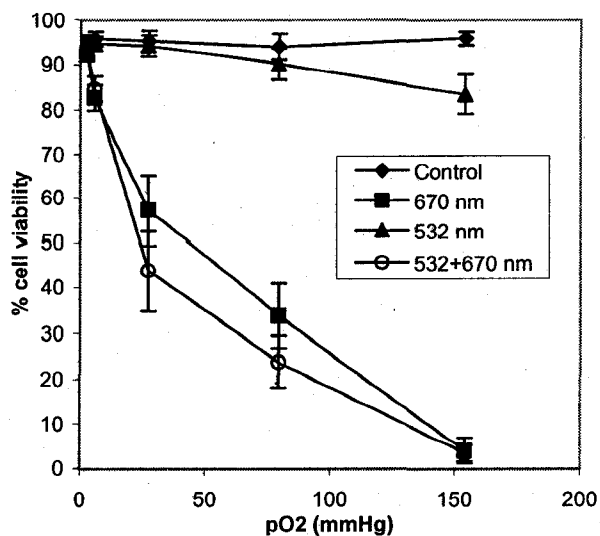
2- γ pulsed irradiation at 532 nm. To study photoinactivation of cancer cells in hypoxic tumors, the cell survival assay was performed with a 2- γ pulsed irradiation at 532 nm under varying pO_2 . Cell survival after incubation with the CuPcS₄, which is a poor 1O_2 generator, and 2- γ PDT showed a significant reduction in cell survival (survival of $85.34 \pm 2.2\%$, $P = 10^{-7}$) under normal pO_2 condition. This corresponds to a significant improvement over 1- γ PDT since no cell phototoxicity was measured with the CuPcS₄ irradiated with 670 nm continuous light. However, photoinactivation was still dependant on the presence of oxygen since no significant cell death was induced at the lowest pO_2 tested, i.e. 2.7 mmHg.

Using ZnPcS₄, which is a potent 1O_2 generator, the 2- γ pulsed irradiation at 532 nm induced a similar level of cell death as compared to that observed with the CuPcS₄. Under normal oxygen concentration, the cell survival shifted from $\sim 3\%$ with 1- γ at 670 nm to $>85\%$ following 2- γ at 532 nm. Under a pO_2 of 2.7 mm Hg, neither irradiation protocol did significantly affect cell survival.

2- γ irradiation at 532 and 670 nm. Jurkat cell viability following 2- γ PDT, using a combination of 532 nm pulsed and 670 nm continuous light and ZnPcS₄ as Ps, demonstrated the same oxygen dependency as that observed following irradiation with 670 nm laser light only ($P = 0.55$ at pO_2 of 154 mmHg; Figure IV.3a).

Conversely, irradiation of Jurkat cells incubated with the poor 1O_2 generator CuPcS₄ demonstrated that the 2- γ irradiation at 532 and 670 nm led to a significantly higher reduction of cell survival ($86.62 \pm 1.8\%$) than following 1- γ PDT at 670 nm ($93.6 \pm 2.05\%$) (Figure IV.3b). However, the efficacy of photoinactivation of Jurkat cells was still dependent on the concentration of molecular oxygen since both irradiation protocols did not induce significant cell death with either Ps under the most hypoxic condition, i.e. at a pO_2 of 2.7 mmHg.

a)



b)

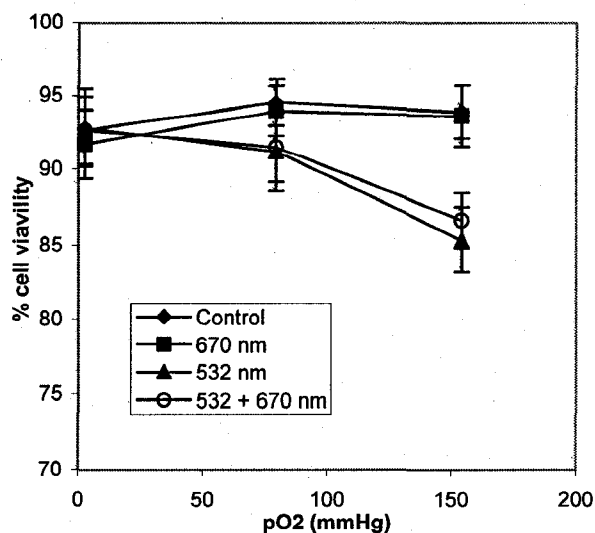


Figure IV.3. Viability of Jurkat cells incubated with a) ZnPcS₄ and b) CuPcS₄ following different irradiation condition. Cells were incubated with 10 μ M of Ps, placed in anaerobic cuvette and irradiated with 1- γ or 2- γ at fluence of 320 J cm⁻². Each data point represents the average of at least ten different experiments and the error bars in the figures represent standard deviation of the mean.

Discussion

Experimental and clinical evidences suggest that the hypoxic fraction in a solid tumor may reduce its sensitivity towards treatments such as standard radiotherapy, certain anticancer agents, and can severely hamper the effectiveness of PDT (25). Consequently, significantly lower survival and recurrence-free survival were observed, for example, for patients with advanced cancer of the uterine cervix showing a median pO_2 of $< \text{or} = 10$ mmHg compared to those with better oxygenated tumors (median $pO_2 > 10$ mmHg) (26). Therefore, it is important to develop a new therapeutic modality that will successfully induce cancer cell death under hypoxic conditions.

Our results with 1- γ PDT at 670 nm confirm previous reports that molecular oxygen is mandatory to induce cytotoxicity with activated phthalocyanine (3) and hematoporphyrin derivative (27-29). Under a pO_2 of about 40 mmHg, the generation of 1O_2 by ZnPcS₄ was largely reduced, reaching an undetectable level under about 20 mmHg. However, a large fraction (~58%) of the Jurkat cells incubated with ZnPcS₄ and irradiated with a 1- γ at 670 nm was still viable at a pO_2 of 20 mmHg. This result suggests that 1O_2 is not the only cytotoxic species involved in cell death following 1- γ activation at 670 nm. Since the photoinactivation of the Jurkat cells continued to increase at pO_2 lower than 20 mmHg, a type I mechanism mediated by ZnPcS₄ $^{\bullet-}$ radical anion and requiring the presence of oxygen was probably involved in the observed cell toxicity.

To circumvent the important reduction of photoinactivation observed at a pO_2 lower than 20 mmHg, two types of 2- γ irradiation protocols were studied. The 2- γ pulsed irradiation at 532 nm was tested since it has the potential to populate the upper triplet T_n state of CuPcS₄ and ZnPcS₄ from which radical anions could be produced via a sequential mechanism in hypoxic medium (17). Regarding the 2- γ irradiation at 532 and 670 nm, sequential absorption of both laser light selectively improved excitation of T_1 to the T_n state. We hypothesize that photoinactivation of cancer cells using either of these 2- γ irradiation protocols is less dependent on the presence of oxygen than the 1- γ at 670 nm.

Surprisingly, neither 2- γ irradiation protocol, using ZnPcS₄ or CuPcS₄ as Ps, resulted in photoinactivation of Jurkat cells under hypoxic condition. Using the ZnPcS₄, which is a potent ¹O₂ generator, under normal pO₂, a similar ability to induce cell death was measured following 2- γ PDT at 532 and 670 nm as compared to 1- γ PDT at 670 nm. It is noteworthy that even at a pO₂ lower than 20 mmHg, where the generation of ¹O₂ should be inexistent, the efficacy of these two irradiation protocols was similar. These results suggest that addition of pulsed light at 532 nm to the continuous 670 nm PDT did not modify the ability of ZnPcS₄ to induce cancer cell death and that the type I pathway was dominant with these two irradiation protocols, even under low oxygen concentration.

Conversely, the 2- γ irradiation at 532 and 670 nm with CuPcS₄ as Ps increased photoinactivation of the Jurkat cells as compared to 1- γ PDT at 670 nm under well oxygenated condition. Since CuPcS₄ is a poor ¹O₂ generator, these results suggest that 2- γ PDT induces cell death following the type III pathway. However, the efficacy of this alternative irradiation protocol was still dependent upon the presence of molecular oxygen since no significant photoinactivation was measured under hypoxic condition.

Regarding the 2- γ pulsed irradiation at 532 nm, the same pattern of cell death induction was measured with both the ZnPcS₄ and CuPcS₄. Since the 2- γ pulsed irradiation at 532 nm reduced the ability of ZnPcS₄ to generate ¹O₂ and since CuPcS₄ is a poor ¹O₂ generator, we conclude that this 2- γ PDT protocol induces cell death without the involvement of ¹O₂.

In the case of ZnPcS₄, which is a potent ¹O₂ generator, we showed that 1- γ PDT at 670 nm is much more efficient than the 2- γ pulsed irradiation at 532 nm to induce cell death. Conversely, while no cell death was induced following the 1- γ PDT at 670 nm with CuPcS₄, the 2- γ PDT at 532 nm led to a modest but significant induction of cell death.

In previous work (14), we have shown that the transient absorption spectrum of CuPcS₄ consist of triplet-excited states that absorb in the range of 475-550 nm and 700-750 nm. In this study, we find that CuPcS₄-PDT with 532 nm laser light can inactivate Jurkat cells without the involvement of ¹O₂. Since CuPcS₄ is activated outside the tissue transparency window (750-

1100), using pulsed light at 750 nm would be more appropriate for potential clinical PDT application.

In conclusion, our data suggest that the T_n excited state of a Ps can be populated after 2- γ irradiation at 532 nm or the combination of 532 nm and 670 nm. Both alternative irradiation protocols can induce reactive species leading to cell death. In this type III process, the Ps is consumed by the reaction, which may result in a decrease in the efficiency of the 2- γ sensitization process. Thus this method would have to be far more toxic than the type II process to produce a significant cell kill with the same light and drug doses. Further, the probability that pulsed photon (532 nm) excites the photosensitizer molecule to triplet state, and inside the same pulse re-excites the excited molecule to T_n state, is very small. Thus, the type III process is underestimated and represents the minimal effect that could be recorded. Finally, in order to induce biological damage, it appears that the type III pathway still requires the presence of molecular oxygen to propagate damage inflicted by the radical anions.

Acknowledgments

Funding for this research was provided by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR, grant no MOP-37768) (J.E.v.L.), the Canadian Institute for Photonics Innovations (D.H.) and by the Intelligent Materials and Systems Institute of the University of Sherbrooke (D.H.).

References

1. van den Bergh, H. (2001) Photodynamic therapy of age-related macular degeneration: History and principles. *Semin. Ophthalmol.* **16**, 181-200.
2. Dougherty, T. J. (1987) Photosensitizers: therapy and detection of malignant tumors. *Photochem. Photobiol.* **45**, 879-889.
3. Dougherty, T. J., C. J. Gomer, B. W. Henderson, G. Jori, D. Kessel, M. Korbely, J. Moan and Q. Peng (1998) Photodynamic therapy. *J. Natl. Cancer Inst.* **90**, 889-905.
4. Rosenthal, I., C. M. Krishna, P. Riesz and E. Ben-Hur (1986) The role of molecular oxygen in the photodynamic effect of phthalocyanines. *Radiat. Res.* **107**, 136-142.
5. Foote, C. S. (1991) Definition of type I and type II photosensitized oxidation. *Photochem. Photobiol.* **54**, 659-664.

6. Sharman, W. M., C. M. Allen and J. E. van Lier (2000) Role of activated oxygen species in photodynamic therapy. *Methods Enzymol.* **319**, 376-400.
7. Andreoni, A., R. Cubeddu, S. De Silvestri, P. Laporta, and O. Svelto (1982) Two-step laser activation of hematoporphyrin derivative. *Chem. Phys. Lett.* **88**, 37-39.
8. A. Andreoni, A. (1987) Two-step photoactivation of hematoporphyrin by excimer-pumped dye-laser pulses. *J. Photochem. Photobiol. B. Biol.* **1**, 181-193.
9. Leupold, D. and W. Freyer (1992) Proposal of modified mechanisms for photodynamic therapy. *J. Photochem. Photobiol. B. Biol.* **12**, 311-313.
10. Stiel, H., K. Teuchner, A. Paul, W. Freyer and D. Leupold (1994) Two-photon excitation of alkaly-substituted magnesium phthalocyanine: Radical formation via higher excited states. *J. Photochem. Photobiol. A. Chem.* **80**, 289-298.
11. Fluhler, E. N., J. K. Hurley and I. E. Kochevar (1989) Laser intensity and wavelength dependence of Rose-Bengal-photosensitized inhibition of red blood cell acetylcholinesterase. *Biochim. Biophys. Acta.* **990**, 269-275.
12. Smith, G., W. G. McGimpsey, M. Lynch, I. E. Kochevar and R. W. Redmond (1994) An efficient oxygen independent two-Photon photosensitization mechanism. *Photochem. Photobiol.* **59**, 135-139.
13. Langlois, R., H. Ali, N. Brasseur, J. R. Wagner and J. E. van Lier, (1986) Biological activities of phthalocyanines-IV. Type II sensitized photooxidation of L-Tryptophan and cholesterol by sulfonated metallo phthalocyanines. *Photochem. Photobiol.* **44**, 117-123.
14. Fournier, M., C. Pépin, D. Houde, R. Ouellet, J. E. van Lier (2003) Ultrafast studies of the excited-state dynamics of copper and nickel phthalocyanine tetrasulfonates : Potentiel sensitizers for the two-photon photodynamic therapy of tumours. *Photochem. Photobiol. Sci.* **2**, 1-8.
15. Mir, Y., D. Houde and J. E. van Lier (2006) Two-photon absorption of copper tetrasulfophthalocyanine induces phototoxicity towards Jurkat cells in vitro. *Photochem. Photobiol. Sci.* **5**, 1024-1030.
16. Mir, Y., D. Houde and J. E. van Lier (2008) Photodynamic inhibition of acetylcholinesterase following two-photon excitation of copper tetrasulfophthalocyanine. *Lasers Med. Sci.* **23**, 19-25.

17. Kaneko Y., Y. Nishimura, T. Arai, H. Sakuragi, K. tokumaru and D. Matsunaga (1995) UV light and red light chemistry of metallophthalocyanine: Wavelength dependent photochemical reduction of tetrasodium salts of Zn(II) and Cu (II) tetrasulphonatophthalocyanines with amines. *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* **89**, 37-44.
18. Ali, H., R. Langlois, J. R. Wagner, N. Brasseur, B. Paquette, and J. E. van Lier (1988) Biological activities of phthalocyanines-X. Syntheses and analyses of sulfonated phthalocyanines. *Photochem. Photobiol.* **47**, 713-717.
19. Weber, J. H. and D. H. Bush (1965) Complexes derived from strong field ligands XIX. Magnetic properties of transition metal derivatives of 4,4',4'',4'''-tetrasulphophthalocyanines. *Inorg. Chem.* **4**, 469-471.
20. Hodgson, E. K., J. M. McCord and I. Fridovich (1973) Anaerobic spectrometry: An improved cuvette. *Anal. Biochem.* **5**, 470-473.
21. Turro, N. J. (1991) *Modern Molecular Photochemistry*. University Science Books, Sausalito, CA.
22. Marengo, S., D. Houde, N. Brasseur, T. L. Nguyen, R. Ouellet, J. E. van Lier (1994) Measure of the singulet oxygen yield generated from naphthalocyanine photosensitizers. *J. Chim. Phys.* **91**, 1211-1219.
23. Du, H., R. A. Fuh, J. Li, A. Corkan and J. S. Lindsey (1998) PhotochemCAD: A computer-aided design and research tool in photochemistry. *Photochem. Photobio.* **68**, 141-142.
24. Moore, G.E., R.E. Gerner and H.A. Franklin (1967) Culture of normal human leukocytes. *J. Am. Med. Ass.* **199**, 519-524.
25. Chen Q., Z. Huang, H. Chen, H. Shapiro, J. Beckers and F. W. Hetzel (2002) Improvement of tumor response by manipulation of tumor oxygenation during photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.* **76**, 197-203.
26. Höckel M, C. Knoop, K. Schlenger, B. Vorndran, E. Baussmann, M. Mitze, P. G. Knapstein and P. Vaupel (1993) Intratumoral pO₂ predicts survival in advanced cancer of the uterine cervix. *Radiother. Oncol.* **26**, 45-50.
27. Lee See, K., I. J. Forbes and W. H. Betts (1984) Oxygen dependency of photocytotoxicity with haematoporphyrin derivative. *Photochem. Photobiol.* **39**, 631-634.
28. Moan, J. and S. Sommer (1985) Oxygen dependence of the photosensitizing effect of hematoporphyrin derivative in NHIK 3025 cells. *Cancer Res.* **45**, 1608-1610.

29. Mitchell, J. B., S. McPherson, W. DeGraff, J. Gamson, A. Zabel and A. Russo (1985)
Oxygen dependence of hematoporphyrin derivative-induced photoinactivation of Chinese
hamster cells. *Cancer Res.* **45**, 2008-2011.

CHAPITRE V. QUATRIÈME ARTICLE

Youssef Mir, Johan E. van Lier, Jean-François Allard, Denis Morris and Daniel Houde,
Two-photon absorption cross section of excited phthalocyanines by a femtosecond Ti-Sapphire laser, Photochemical and Photobiological Sciences, soumis.

V.1. Buts

L'objectif de ce travail est la mesure de la σ_2 de l'absorption à 2- γ d'une série de Pc et le Photofrin. Ceci permettra de comparer leur efficacité à absorber 2- γ simultanés. Les molécules de Pc ont été utilisées grâce à leur photocytotoxicité et leur efficacité dans la TPD à 1- γ . Le Photofrin est le Ps approuvé entre autres au Canada pour la TPD à 1- γ de certains types de cancer.

V.2. Hypothèses

La TPD à 2- γ (excitation simultanée par une source laser fs) pourrait occlure des néovaisseaux qui poussent au centre de la rétine. Ce type de thérapie pourrait être efficace pour le traitement de la dégénérescence maculaire liée à l'âge. Pour être efficace dans ce protocole les Ps devraient avoir une σ_2 d'absorption à 2- γ de l'ordre de ≥ 100 GM (1 GM = 10^{-50} cm⁴ s photon⁻¹ mol⁻¹). Malheureusement le Photofrin a une σ_2 autour de 10 GM ce qui rend ce Ps un candidat non favorable pour cette thérapie. Les Pc, d'après deux études publiées, représentent des Ps qui répondent à cette exigence.

Two-photon absorption cross section of excited phthalocyanines by a femtosecond Ti-Sapphire laser

Youssef Mir,^a Johan E. van Lier,^a Jean-François Allard,^a Denis Morris^b and Daniel Houde^{*a}

^a Department of Nuclear Medicine and Radiobiology, Faculty of Medicine and Health Sciences, Université de Sherbrooke, QC, Canada, J1H 5N4.

Fax: 819-564-5442; Tel: 819-346-1110, ext. 14502; E-mail:

Daniel.Houde@usherbrooke.ca

^b Department of physics, Faculty of Sciences, Université de Sherbrooke, QC, Canada, J1K 2R1

Abstract

In the past few years, photodynamic therapy (PDT) has become a major treatment for neovascular age-related macular degeneration (AMD) in which there is abnormal growth of choroidal neovasculation (CNV) that eventually obscures central vision, leading to blindness. However, one of the main limitations of current PDT is the relatively low specificity of the photosensitizer (Ps) and light for pathological tissue which may induce damage to adjacent healthy tissue. An alternative approach to circumvent the specificity limitation is to improve the irradiation process. In particular two photon ($2-\gamma$) excitation promises a more precise illumination of the target tissue. Ps are activated by the simultaneous absorption of $2-\gamma$ delivered by ultra-fast pulses of near infrared light. In order to evaluate the efficiency of phthalocyanine (Pc) dyes for $2-\gamma$ absorption we measured $2-\gamma$ absorption cross sections (σ_2) of a number of metalated Pc (MPc) dyes at $\lambda_{\text{ex}} = 800$ nm using a femtosecond laser. The studied Pc molecules vary by the type of the central metal ion (Al or Zn) and the number of peripheral sulfo substituents (MPcS). Each MPc dye of our series shows an improved $2-\gamma$ absorption σ_2 as compared to that obtained for Photofrin (9.3 ± 0.3 GM, with $1 \text{ GM} = 10^{-50} \text{ cm}^4 \text{ s photon}^{-1} \text{ mol}^{-1}$), the Ps currently approved for $1-\gamma$ PDT. Our data show a 2.5-fold enhancement for AlPcCl, AlPcS_{2adj} and ZnPcS_{3C9}, up to 10-fold (85.84 ± 2.17 GM) for the ZnPcS₄ dye relative to Photofrin. These findings confirm the efficiency of Pc for $2-\gamma$ absorption processes and represent the first detailed comparison study of $2-\gamma$ absorption σ_2 between Photofrin and Pc dyes.

Introduction

Photodynamic therapy (PDT) is a promising new treatment of cancer as well as several non-malignant conditions such as age-related macular degeneration (AMD).¹ This treatment requires three components, a photosensitizer (Ps), molecular oxygen and light of an appropriate wavelength. After localization of the Ps in the target tissue, illumination will produce various reactive oxygen species that can induce cell death and vascular damage.²⁻⁴ In the past few years, PDT has become the treatment of choice for neovascular AMD in which there is abnormal growth of choroidal neovasculation (CNV) that eventually obscures central vision, leading to blindness.¹ One photon ($1-\gamma$) PDT is used to target the neovasculation, while the Ps is still

primarily in circulation, by delivering continuous wave light from a diode laser via a fundus camera to give a spot of a few mm in diameter.⁵ To date, all clinical PDT, including that for AMD, has used 1- γ excitation of the Ps, using light in the visible range (630 to 670 nm). However, one of the main limitations of current PDT is the relatively low specificity of the Ps for pathological tissue. Partial selectivity is achieved by focusing the laser beam to the desired treatment area. Nevertheless, adjacent healthy tissue may also be damaged,⁶ so that a large research effort has been directed to the development of new Ps with higher disease affinity. An alternative method to circumvent this limitation is to activate the Ps by the simultaneous absorption of two photon (2- γ) excitation with ultrashort (femtosecond laser ~ 100 fs) pulses of near infrared light (750-900 nm). The use of near-infrared photons is also desirable, since these have greater penetration through tissues. Two-photon PDT, using a focused light beam, permits effectively targeting not only in the transverse plane, but also along the laser beam, through a three-dimensional surface. This is due to the non-linear interaction mechanism, allowing the targeting of femtoliter treatment volumes,⁵ i.e. the volume of an individual cell. Hematoporphyrin derivatives (HpD) (Photofrin) and benzoporphyrin (verteporfin) have recently been used as Ps to demonstrate proof-of-principle of 2- γ killing of vascular endothelial cells in vitro⁵ and complete blood vessel occlusion in the chicken chorioallantoic membrane model.⁷ Nevertheless, HpD are, per se, not the best Ps for 2- γ PDT due to their relatively low 2- γ absorption cross section (σ_2),⁵ poor singlet oxygen production⁸ and prolonged skin photosensitivity in patients after PDT treatment.⁹

The current standard treatment for CNV is verteporfin-PDT, which uses laser light (~ 680 nm) to activate the photosensitizing dye accumulated within the CNV. Although PDT causes less damage to the retina overlying CNV than thermal laser, in normal primate and rat models, PDT damages photoreceptors and retinal pigment epithelial cells.³⁵ Although there has been no histologic evidence of damage to normal human retinal cells after PDT, patients treated with PDT experience visual disturbances and significant acute vision loss.³⁵ Furthermore, benefits from verteporfin-PDT are limited due to recurrence of the CNV associated with AMD, thus requiring three treatments during the first year.¹¹ Notably, verteporfin-PDT is expensive and as such not available to all patients who may benefit from this treatment.¹²

Consequently, there is much interest in developing new photosensitizing agents with improved efficacy and higher selectivity. Among several classes of second-generation Ps that are

advanced for PDT, phthalocyanines (Pc) have been studied extensively and are reported as being among the most promising Ps.¹³ Their advantageous properties relate to their photophysical characteristics, facile synthesis and chemical alterations allowing modification through the addition of substituents to the periphery of the macrocycle.¹⁴ Further, we have shown, previously, that tetrasulfonated Pc (CuPcS₄, ZnPcS₄) can inactivate cells and enzymes without singlet oxygen following 2- γ excitation.¹⁵⁻¹⁷ Further, Pc exhibit minimal systemic toxicity, and do not cause skin photosensitization.¹² Other workers have proposed that chloroaluminium sulfonated phthalocyanine (ClAlPcS) and ZnPcS₄, selectively localise in CNV and that both Ps can induce a closure of the chroidal vessels following 1- γ PDT with minimal damage to the retina tissues.^{12,18} However, the available information on simultaneous 2- γ absorption σ_2 of metallo-Pc (MPc) remains limited.

Published σ_2 values for MPc dye are quite different. Meshalkin and Chunosova¹⁹ have obtained a 2- γ absorption $\sigma_2 \sim 540$ GM (1 GM = 10^{-50} cm⁴ s photon⁻¹ mol⁻¹) at $\lambda_{ex} = 800$ nm for a mixture of sodium salts of AlPcS₂₋₄ using femtosecond fluorescence technique. Drobizhev et al. found that MPc have a moderately strong 2- γ absorption $\sigma_2 = 75-200$ GM at $\lambda_{ex} = 1180-1550$ nm²⁰ using a relative fluorescence technique.

Their MPc molecules vary by the type and position of substitution (α or β), the number of substituent groups (4, 8 or 16), and the type of central metal ion (Al³⁺ or Zn²⁺). An other report, based on a theoretical study of ZnPc and MgPc dyes, have shown a 2- γ absorption σ_2 around 100 GM at $\lambda_{ex} = 800$ nm.²¹

Here we studied the 2- γ properties and measured the absorption σ_2 of a number of differently sulfonated Al- and ZnPcS at $\lambda_{ex} = 800$ nm. Exciting the PS at 800 nm is advantageous and practical in view of the therapeutic window for PDT. Furthermore, since Photofrin exhibits its highest 2- γ absorption cross section value at 800 nm (10 GM, decreasing to 5 GM at 900 nm)⁵, comparing the efficiency of MPc using similar experimental conditions should be relevant. To determine an optimal 2- γ excitation wavelength, doubling the maximum 1- γ excitation wavelength is often a good approximation. Decreasing the excitation to 700 nm is disadvantageous since MPc absorb at this wavelength, which may result in interference by 1- γ PDT. Increasing the 2- γ excitation wavelength to 900 nm likely results in lower PDT efficacy due to the lack of absorbance by the MPc at 450 nm.

We also measured fluorescence quantum yields by the comparative method. These MPc have shown good intracellular localization and cytotoxicity following 1- γ PDT.²²⁻²⁴ The aim of the present study was to establish quantitatively the 2- γ absorption σ_2 for these MPc and to compare their efficiency to that of Photofrin, using similar experimental conditions.

Materials and methods

Photosensitizer

The tetrasulfonated zinc(II) Pc (ZnPcS₄) were prepared via condensation of sulfonated precursors and purified extensively.²⁵ The synthesis of the substituted trisulfonated Pc (ZnPcS₃C₉) has previously been reported.²² Unsubstituted zinc phthalocyanine (ZnPc) 97% and aluminium phthalocyanine chloride (AlPcCl) 90% were purchased from Aldrich. Photofrin® (Porfimer sodium) was obtained from QLT Phototherapeutics Inc. and Rhodamine 6G (Rh6G) was purchased from Exciton, Inc. The adjacently disulfonated AlPcS₂adj was prepared as previously described.²⁶ The metallo phthalocyanines structures are illustrated in Figure V.1.

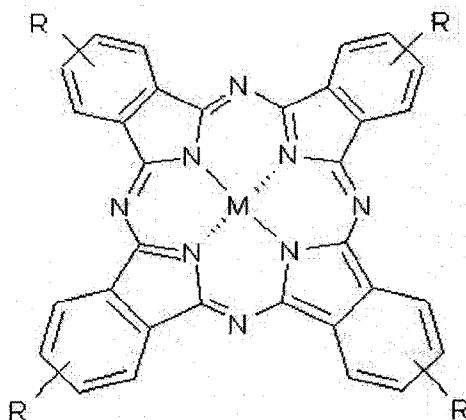


Figure V.1 MPc structure. ZnPc: M = Zn, R = H; ZnPcS₄: M = Zn, R = SO₃Na; ZnPcS₃C₉: M = Zn, R = SO₃Na (3x) and R = C₂(CH₂)₆CH₃ (1x); AlPcCl: M = AlCl, R = H; AlPcS₂adj: M = Al, R = H (2x) and R = SO₃Na (2x) on adjacent benzyl rings

Fluorescence quantum yields

Fluorescence quantum yields (Φ_F) were determined by the comparative method (eqn 1),²⁷

$$\Phi_F(X) = \Phi_F(Std) \left(\frac{Grad_X}{Grad_{Std}} \right) \left(\frac{\eta_X^2}{\eta_{Std}^2} \right) \quad (1)$$

where the subscripts Std and X denote standard and sample, respectively, Φ_F is the fluorescence quantum yield, Grad is the gradient from the plot of integrated fluorescence intensity versus the absorbance, and η is the refractive indices of solvents. The measurement of the gradients was done following a HORIBA Jobin Yvon's guide. This method has been applied previously to Φ_F measurement of a series of aluminium and zinc based phthalocyanines.^{28,29}

ZnPc and AlPcCl in DMSO and Photofrin in phosphate buffer saline (pH = 7.4) were used as a standard, Φ_F (ZnPc) = 0.18,³⁰ Φ_F (AlPcCl) = 0.34²⁸ and Φ_F (Photofrin) = 0.027.³¹ Both the sample and the standard were excited at the same relevant wavelength (400 nm). The 1- γ absorption and fluorescence were measured with a spectrophotometer (HITACHI, U-2000) and a fluorescence spectrophotometer (HITACHI, F-2000), respectively.

Two photon induced fluorescence

The schematic representation of the experimental is shown in Figure V.2. For our 2- γ induced fluorescence measurement an amplified Ti:sapphire laser system was used as the excitation source. This Spectra-Physics' system consists of an oscillator (Tsunami) pumped by a solid-state laser (Millennia) followed by an amplifier (Spitfire) which is pumped by another solid-state laser (Merlin). The system delivers 80 fs laser pulses at 800 nm and at a repetition rate of 1 kHz. The average power of the output laser beam was about 340 mW. Further attenuation could be done using a series of neutral filters. A lens with a focal length of 75.6 mm was used to focus the beam vertically into a 10 mm quartz fluorescence cell. The focal point was located ~ 1 cm after the cuvette in order to avoid thermal destruction of cell. The fluorescence signal that was transmitted through the side window of the cell was focused through two lenses into the entrance slit of a $\frac{1}{4}$ m monochromator (ISA, Instruments SA, Inc.). Neutral filters placed before the monochromator can attenuate the Rh6G 2- γ fluorescence intensity in order to avoid signal saturation of our detector. The fluorescence signal was detected with a photomultiplier (Hamamatsu Modele H5773-01). A gated integrator and a boxcar averager were used to obtain the fluorescence intensity every second. Each data point corresponds to the mean value of 1000 shots/sec during 60 sec. The experiments are performed on different days and measurements show good reproducibility.

Two-photon excited fluorescence σ_2 were determined using the reference method. A quartz cell with a solution under study was placed in the focal region of a focused optical beam.

After the detection of the 2- γ fluorescence intensity at different incident intensity, the cell with the solution under study was replaced by a similar cell with a reference sample.

The fluorescence intensities are used to obtain a 2- γ absorption σ_2 for the photosensitiser using eqn (2)³²

$$\sigma_{2s} = \kappa \frac{C_r}{C_s} \frac{I_{\lambda s}}{I_{\lambda r}} \frac{FI_{\lambda s}}{FI_{\lambda r}} \frac{\sum FI_r}{\sum FI_s} \frac{\Phi_r}{\Phi_s} \sigma_{2r} \quad (2)$$

where the subscripts r and s designate the reference and the sample respectively. The term σ_2 is the 2- γ absorption cross section, κ is correction factor which is equal to three (see the appendix), C is the concentration, I_λ is the 2- γ induced fluorescence intensity at the wavelength λ , FI_λ is the 1- γ induced fluorescence at wavelength λ and $\sum FI$ is the integrated intensity of the 1- γ induced fluorescence spectra. Φ represents the 1- γ fluorescence quantum yield, which is assumed to be the same under 2- γ excitation conditions. The 2- γ induced emission signal was monitored at 680 nm for the MPc dye, at 556 nm for the Rh6G dye and at 630 nm for the Photofrin dye. Two-photon absorption σ_{2s} was measured by comparing the 2- γ induced fluorescence intensity ($I_{\lambda s}$) of a studied sample with the intensity ($I_{\lambda r}$) of a reference sample (Rh6G in our case). All the cross section values were given in GM units ($1\text{GM} = 10^{-50} \text{ cm}^4 \text{ s photon}^{-1} \text{ mol}^{-1}$). For Rh6G in methanol, the quantum yield of fluorescence is $\Phi_r = 0.95$.³³ Concentrations used for the 2- γ cross section measurements were generally set at 100 μM for MPc and 46.2 μM for Rh6G.

It should be noted that the comparative method used here rely on the exact value for the σ_{2r} . There is, however, discrepancies in the reported σ_{2r} values at 800 nm for Rh6G in methanol, which therefore causes uncertainties in the values of σ_{2s} that can be determined. We have chosen to use a σ_{2r} value of 134 GM^{34} since this value was obtained using 32.6 μM of Rh6G which is close the concentration used in this study (46.2 μM).

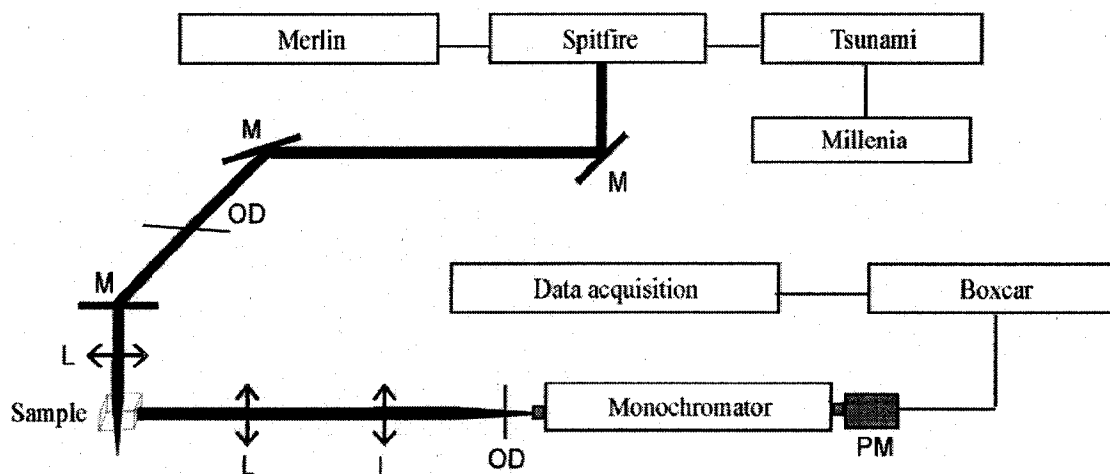


Figure V.2 Schematic of experimental setup: M: mirrors; OD: optical density; L: lens; PM: photomultiplier

Results

Fluorescence quantum yields

The integrated fluorescence intensity has been plotted as a function of absorbance for Photofrin in methanol, in Figure V.3. The R^2 coefficient deduced from a linear regression on the curve indicates a nice linear behavior. Similar results are obtained for all our Pc sample. The extracted Φ_F values are then valid and acceptable. Table V.1 shows the Φ_F values, the Grad values, and the determination coefficients (R^2) for both the sample and the standard Ps dyes diluted in different solvents.

The Φ_F values of all our Ps samples were similar and typical of MPc complex.^{28,29} Although the Φ_F values of AlPc (AlPcCl, AlPcS_{2adj}) (0.221, 0.149) and ZnPc (ZnPcS_{3C9}, ZnPcS₄) (0.147, 0.104) in methanol are lower than ZnPc (0.18) and AlPcCl (0.34) in DMSO respectively, Photofrin in methanol (0.068) is larger than Photofrin in PBS (0.027).

Table V.1 Φ_F values of Photofrin and MPc in different solvents and Grad values used for the calculations

Ps	Solent	Grad $\times 10^{-6}$	R^2	Φ_F
ZnPc	DMSO	2.172	0.92	0.18 ³⁰
AlPcCl	DMSO	3.01	0.98	0.34 ²⁸
Photofrin	PBS	0.1	0.98	0.027 ³¹
Photofrin	Methanol	0.254	0.99	0.068
AlPcCl	Methanol	2.45	0.94	0.221
AlPcS _{2adj}	Methanol	1.65	0.95	0.149
ZnPcS _{3C9}	Methanol	2.22	0.95	0.147
ZnPcS ₄	Methanol	1.57	0.98	0.104

Two-photon absorption cross section

The 2- γ absorption σ_2 of AlPcCl, AlPcS_{2adj}, ZnPcS_{3C9}, ZnPcS₄ and Photofrin in methanol are presented in Table V.2. The lowest 2- γ absorption σ_2 (9.3 ± 0.3 GM) is obtained for the Photofrin sample while the larger σ_2 value (85.84 ± 2.17) is obtained for the ZnPcS₄ sample. Thus, ZnPcS₄ exhibits a $\sigma_2 \sim 10$ -fold greater than that of Photofrin and ~ 2.5 fold greater than that of the other MPc. AlPcCl, AlPcS_{2adj} and ZnPcS_{3C9} samples have almost the same σ_2 , 33.34 ± 0.59 , 37.18 ± 1.07 and 36.24 ± 0.65 , respectively, i.e. values that are ~ 4 -fold greater than that of Photofrin (9.3 ± 0.3 GM). The character of the 2- γ fluorescence signal was verified by looking at its variation with the excitation intensity. A quasi quadratic behavior has been observed for all the PS samples. The slopes of the plots of 2- γ fluorescence intensity as function of incident intensity for Rh6G, AlPcCl, AlPcS_{2adj}, Photofrin, ZnPcS₄ and ZnPcS_{3C9} are 2.05, 1.86, 1.94, 2.2, 1.93, and 1.95, respectively.

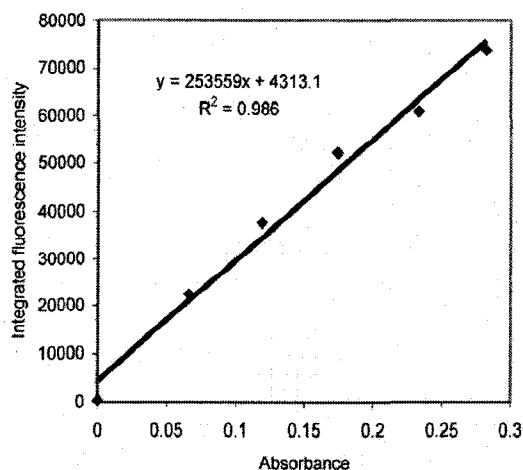


Figure V.3 Example of plot of integrated fluorescence intensity as function of absorbance for Photofrin in methanol

Table V.2 Two-photon absorption cross section of Photofrin and MPc

Ps	$\sigma_{2\gamma}/\text{GM}^a$
Photofrin	9.3 ± 0.3
AlPcCl	33.34 ± 0.59
AlPcS _{2adj}	37.18 ± 1.07
ZnPcS _{3C9}	36.24 ± 0.65
ZnPcS ₄	85.84 ± 2.17

^a Average of four experiments \pm standard deviation

Discussion

AMD is the leading cause of blindness in developed countries, and is caused by the growth of CNV into the normally avascular macular region of the retina. Current treatment regimes have potential to cause collateral damage, or do not remove pre-existing unwanted vasculature.⁷ Experimental and theoretical evidences suggest that 2- γ excitation PDT can be applied to cause local blood vessel occlusion without damaging surrounding retinal tissues.^{5,7} The low 2- γ absorption σ_2 ,⁵ lack of selectivity and presence of dark toxicity⁹ of Photofrin, i.e. the Ps used presently for 1- γ PDT, renders this Ps unattractive for the 2- γ method. Therefore, it is important

to develop a new therapeutic agent that will successfully treat wet AMD by 2- γ therapy without any side effects. In this study we evaluated the 2- γ fluorescence and quantum yield of a series of phthalocyanine using the reference and comparative methods, respectively.

Our results show that Φ_F values of Photofrin are lower in PBS than in methanol, whereas the Φ_F values of the MPc measured in methanol are lower than those measured in DMSO (Table V.1). The lower Φ_F values of the sulfonated MPc in methanol likely reflect tendencies to aggregate in this relative polar solvent. Aggregation reduces the probability of radiative process (fluorescence) since several non-radiative channels open when the molecular structure becomes more complex. The higher value of Φ_F for the AlPc complexes compared to the ZnPc complexes seems to be related to the heavy atom effect, which encourages intersystem crossing to the triplet state in the case of the Zn complex.²⁷ In the case of Photofrin, the lower fluorescence yield in PBS has also been suggested to result from enhanced aggregation.³⁵

The 2- γ absorption cross sections were measured at a 800 nm excitation wavelength, i.e. at a wavelength where the Ps samples do not absorb (Figure V.4) and consequently, where the 1- γ contributions is negligible. Exciting the MPc at 800 nm with 2- γ of about equal energy (from the same laser) produces an excitation equivalent to the absorption of a single photon possessing twice the energy. Since a single photon at 400 nm excites the MPc to the second excited singlet state, 2- γ at 800 nm should excite this molecule to the same second excited singlet state.

Most tetrapyrroles (Photofrin, HpD and Protoporphyrin IX) used as Ps in 1- γ PDT exhibit a σ_2 of 2-10 GM. For HpD (10^{-3} - 10^{-4} M in methanol at $\lambda_{exc} = 800$ nm) a value of 10.7 GM has been reported,³² with Rh6G reference concentration at 10 mM. For protoporphyrin IX (10^{-5} M in ethanol at $\lambda_{exc} = 790$ nm) a value of 2.0 GM has been reported using the same reference.³⁷ Using 2- γ laser scanning microscope, a similar $\sigma_2 = 10$ GM value has been reported for Photofrin ($100 \mu\text{g ml}^{-1}$ in methanol at $\lambda_{exc} = 800$ nm).⁵ The value obtained for Photofrin in the current study (9.3 GM) is in agreement with these reported values (Table V.2).

In the case of MPc, we found that AlPcCl, AlPcS_{2adj}, ZnPcS_{3C9} and ZnPcS₄ have a significant higher 2- γ absorption σ_2 as compared to that observed for Photofrin (Table V.2). Although the MPc slightly absorb at the fluorescence wavelength (680 nm), the quadratic behaviour of the 2- γ fluorescence signal with the excitation intensity implies negligible contribution of the absorption of MPc at this wavelength.

Theoretical study between Pc and tetrabenzoporphyrins suggest that such differences might originate from a larger intramolecular charge transfer in the various higher excited states of MPc.²¹

It is noteworthy that among the MPc studied the ZnPcS₄ is the most efficient Ps for the 2- γ process. This may be due to two main considerations. Firstly, the substitution of ZnPcS₄ by four negatively-charged SO₃Na groups could enhance drastically a 2- γ transition.²⁰ Secondly, for molecules with a center of symmetry, the selection rules for 1- γ and 2- γ transitions are mutually exclusive: 1- γ transitions occur between states with different parities ($g \rightarrow u$ or $u \rightarrow g$), whereas 2- γ transition are allowed between states with the same parity ($g \rightarrow g$ or $u \rightarrow u$).³⁸ It has been also found that in centrosymmetric porphyrins there may exist 2- γ -allowed transitions that couple the g-parity ground state to an excited electronic state of the same parity ($g \rightarrow g$ transition). The calculations place this strongly 1- γ -forbidden transition near the 1- γ -allowed Soret transition, which suggests that, if the laser frequency is tuned to 700–800 nm, the 2- γ absorption σ_2 can undergo significant enhancement.³⁸ Furthermore, other experimental findings confirm that π centers play a most crucial role in the properties of 2- γ absorption materials.³⁹ To elucidate the relationships between molecular symmetry, overall charge and 2- γ absorption σ_2 , further measurements of other phthalocyanines with different symmetry are in progress in our laboratories.

In conclusion, our findings demonstrate the efficiency of phthalocyanines in comparison to Photofrin for 2- γ absorption processes. Our data also provide a database to guide the development of novel photosensitizers with improved 2- γ σ_2 , as required for 2- γ PDT of medical conditions such as AMD.

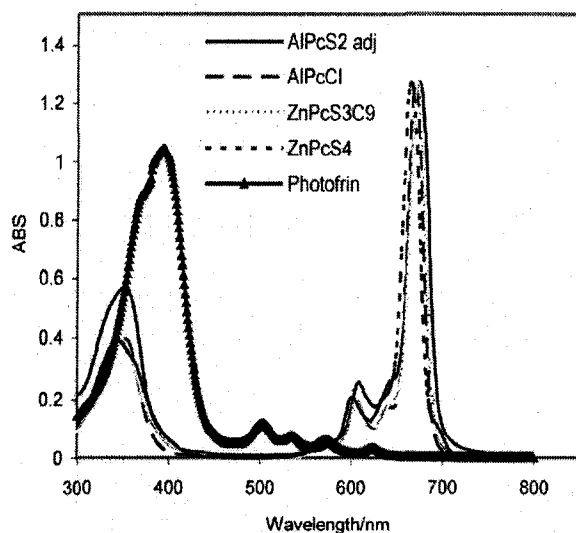
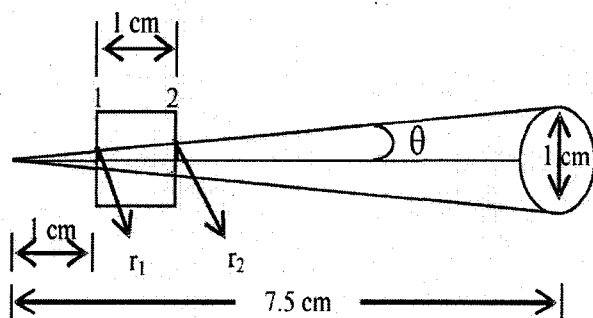


Figure V.4 Absorption spectra of 10 μM MPc (AlPcS_{2adj}, AlPcCl, ZnPcS₃C₉, ZnPcS₄) and Photofrin.

Appendix: Determination of correction factor κ

Consider a homogenous 2- γ absorbing medium of length 1 cm irradiated by a focused laser pulse of intensity $I(w, r, z)$, where w is the frequency, r is a beam ray and z (7.5 cm) is the distance from the geometrical center of the lens to the focal point (Scheme 1).



Scheme V.1 Schematic diagram of the excitation pathways of the cuvette by a focused laser: r_1 and r_2 are the beam ray at side 1 and 2 respectively and θ is the illumination angle

Since the irradiated volume differ inside the cuvette from side 2 to side 1 (Scheme 1), the total collected fluorescence will not be uniform mainly for MPC and Photofrin for which fluorescence quantum yields are weak.

In order to quantify the difference of excited molecules between the sides 2 and 1, we have determined a correction factor κ as follow.

The transition probability for the 2- γ transition from S_0 to S_i state can be defined as:⁴⁰

$$W^2 = \frac{\sigma^2}{(\hbar w)^2} I^2(w, r, z) \quad (3)$$

where $\hbar w$ is the photon energy and I is the intensity of laser:

$$I = \frac{N \hbar w}{\pi r^2(z)} (\Delta \tau) \quad (4)$$

N is the number of photons and $\Delta \tau$ is the pulse life time. We suppose as an approximation the constancy of the number of photons that go through the cuvette from side 2 to side 1.

ρ_{gg}^o is the molecule density at thermal equilibrium and ground state and ρ_{ff} is the molecule density in the excited state after 2- γ activation. The population equation of the excited state will be governed by the equation:⁴⁰

$$\rho_{ff} = \rho_{gg}^o W^2(w, r, z) \quad (5)$$

N_{bl} (eqn 6) is the total number of molecules excited when the pulses pass through the cuvette (Scheme 1) using a focalized lens.

$$N_{bl} = \int_0^{2\pi} \int_{r_1}^{r_2} \int_{z_1}^{z_2} \rho_{ff} d\phi r dr dz \quad (6)$$

where $z_1 = 1$ and $z_2 = 2$ and the term in the right side of equation 6 is for cylindrical coordinates.

Using equation (3) to (6), N_{bl} will be equal to:

$$N_{bl} = \rho_{gg}^o \frac{N^2 \sigma^2}{(\Delta \tau)^2} \frac{z_2 - z_1}{\pi} \left(\frac{1}{r_1^2} - \frac{1}{r_2^2} \right) \quad (7)$$

In the case where no lens was used, the number of molecules excited (N_{b1}) when the pulses pass through the cuvette will be:

$$N_{b2} = \int_0^{2\pi} \int_0^0 \int_{z_1}^{z_2} \rho_{ff} d\phi r dr dz \quad (8)$$

Using eqn (3) – (5) N_{b2} is equal to:

$$N_{b2} = \frac{1}{\pi r_2^2} (z_2 - z_1) \rho_{gg}^o \sigma_2^2 \frac{N^2}{(\Delta\tau)^2} \quad (9)$$

If we divide eqn (7) by eqn (9), we obtain the following equation

$$\frac{N_{b1}}{N_{b2}} = r_2^2 \left(\frac{1}{r_1^2} - \frac{1}{r_2^2} \right) \quad (10)$$

since $r_1 = z_1 \tan \theta$ and $r_2 = z_2 \tan \theta$ where $z_1 = 1$ cm and $z_2 = 2$ cm, N_{b1} is three time higher than N_{b2} and the correction factor is then equal to 3.

Acknowledgments

Funding for this research was provided by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR, grant no MOP-37768) (J.E.v.L.), the Canadian Institute for Photonics Innovations (D.H.) and by the Intelligent Materials and Systems Institute of the University of Sherbrooke (D.H.).

Notes and references

^a *Department of Nuclear Medicine and Radiobiology, Faculty of Medicine and Health Sciences, Université de Sherbrooke, QC, Canada, J1H 5N4.*

Fax: 819-564-5442; Tel: 819-346-1110, ext. 14502; E-mail: Daniel.Houde@usherbrooke.ca

^b *Department of physics, Faculty of Sciences, Université de Sherbrooke, QC, Canada, J1K 2R1*

- 1 H. van den Bergh, Semin. Ophthalmol., 2001, **16**, 181.
- 2 T. J. Dougherty, Photochem. Photobiol., 1987, **45**, 879.
- 3 T. J., C. J. Dougherty, B. Gomer, W. Henderson, G. Jori, D. Kessel, M. Korbelik, J. Moan and Q. Peng, J. Natl. Cancer Inst., 1998, **90**, 889.
- 4 I. Rosenthal, C. M. Krishna, P. Riesz and E. Ben-Hur, Radiat. Res., 1986, **107**, 136.
- 5 A. Karotki, M. Khurana, J. R. Lepock and B. C. Wilson, Photochem. Photobiol., 2006, **82**, 443.

- 6 J. W. Miller and E. S. Cragoudas, in *Photodynamic Therapy of Ocular Diseases*, ed. E. S. Cragoudas, J. W. Miller and L. Zografos, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, 2004, pp. 63-71.
- 7 K. S. Samkoe, A. A. Clancy, A. Karotki, B. C. Wilson, D. T. Cramb, *J. Biomed. Opt.*, 2007, **12**, 34025.
- 8 R. Langlois, H. Ali, N. Brasseur, J. R. Wagner and J. E. van Lier, *Photochem. Photobiol.*, 1986, **44**, 117.
- 9 C. P. Lowdell, D. Gilson, D. V. Ash, J. A. Holroyd, D. Vernon and S. B. Brown, *Lasers Med. Sci.*, 1992, **7**, 351.
- 10 J. L. Duncan, D. M. Paskowitz, G. C. Nune, D. Yasumura, Y. Haidong, M. T. Matthes, M. A. Zarbin, M. M. Lavail, *Advan. exp. med. biol.*, 2006, **572**, 297.
- 11 The verteporfin in photodynamic therapy study group, *Am. J. Ophthalmol.*, 2001, **131**, 541.
- 12 Y. Huang, G. Xu, Y. Peng, H. Lin, X. Zheng and M. Xie, *J. Ocul. Pharmacol. Therapeut.*, 2007, **23**, 377.
- 13 C. M. Allen, W. M. SHARMAN and J. E. Van Lier, *J. Porphyrins Phthalocyanines*, 2001, **5**, 161.
- 14 W. M. Sharman, C. M. Allen, J. E. van Lier, *Drug Discov Today*, 1999, **4**, 507.
- 15 Y. Mir, D. Houde and J. E. van Lier, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2006, **5**, 1024.
- 16 Y. Mir, D. Houde and J. E. van Lier, *Lasers Med. Sci.*, 2008, **23**, 19.
- 17 Y. Mir, J. E. van Lier, B. Paquette and D. Houde, *Photochem. Photobiol.*, 2008, DOI: 10.1111/j.1751-1097.2008.00311.x
- 18 G. H. Kliman, C. A. Puliafito, G. A. Grossman and W. A. Gregory, *Lasers Surg. Med.*, 1994, **15**, 11.
- 19 Yu. P. Meshalkin and S. S. Chunosova, *Quantum electronics*, 2005, **35**, 527.
- 20 M. Drobizhev, N. S. Makarov, Y. Stepanenko and A. Rebane, *J. Chem. Phys.*, 2006, **124**, 224701.
- 21 X. Zhou, A. M. Ren, J. K. Feng and X. J. Liu, *Can. J. Chem.*, 2004, **82**, 19.
- 22 N. Cauchon, H. Tian, R. Langlois, C. La Madeleine, S. Martin, H. Ali, D. Hunting and J. E. van Lier, *Bioconjugate Chem.*, 2005, **16**, 80.
- 23 C. M. Allen, W. M. Sharman, C. La Madeleine, J. M. weber, R. Langlois, R. Ouellet and J. E. van Lier, *Photochem. Photobiol.*, 1999, **70**, 512.

- 24 S. Kudrevich, N. Brasseur, C. La Madeleine, S. Gilbert, and J. E. van Lier, *J. Med. Chem.* 1997, **40**, 3897.
- 25 J. H. Weber and D. H. Bush, *Inorg. Chem.*, 1965, **4**, 469.
- 26 H. Ali, R. Langlois, J. R. Wagner, N. Brasseur, B. Paquette and J. E. van Lier, *Photochem. Photobiol.*, 1988, **47**, 713.
- 27 A. T. R. Williams, S. A. Winfield and J. N. Miller, *Analyst*, 1983, **108**, 1067.
- 28 M. Idowu and T. Nyokong, *J. Photochem. Photobiol. A*, 2007, **188**, 200.
- 29 D. Atilla, M. Durmus., A. G. Gürek, V. Ahsen and T. Nyokong, *Dalton Trans.*, 2007, 1235.
- 30 P. Jacques and A. M. Braun, *Helv. Chim. Acta*, 1981, **64**, 1800.
- 31 E. Kvam and J. Moan, *Photochem. Photobiol.*, 1990, **52**, 769.
- 32 S. Mathai, D. K. Bird, S. S. Stylli, T. A. Smith and K. P. Ghiggino, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2007, **6**, 1019.
- 33 K. H. Drexhage, *Dye Lasers*, in *Springer Series in Topics in Applied Physics*, ed. F. P. Schafer, vol. 1, Springer, Berlin, 1990, p.187.
- 34 D. A. Oulianov, I. V. Tomov, A. S. Dvornikov and P. M. Rentzepis, *Opt. Commun.*, 2001, **191**, 235.
- 35 G. J. Smith, *Photochem. Photobiol.*, 1985, **41**, 123.
- 36 A. Holder and D. Llagostera, *4OR: A Quarterly Journal of Operations Research*, 2007, DOI: 10.1007/s10288-007-0046-4
- 37 R. L. Goyan and D. T. Cramb, *Photochem. Photobiol.*, 2000, **72**, 821.
- 38 A. Karotki, M. Drobizhev, M. Kruk, C. Spangler, E. Nickel, N. Mamardashvili, A. Rebane, *Opt. Soc. Am. J. B*, 2003, **20**, 321.
- 39 O.-K. Kim, K.-S. Lee, H. Y. Woo, K.-S. Kim, G. S. He, J. Swiatkiewicz and P. N. Prasad, *Chem. Mater.*, 2000, **12**, 284.
- 40 Y. R. Shen, *The Principles of Nonlinear Optics*, Wiley, New York, 1984.

CHAPITRE VI. DISCUSSION

VI.1. Étude photochimique de la TPD à deux photons

VI.1.1. Choix des molécules photosensibilisantes

Comme mentionné dans l'introduction, le CuPcS₄ se montre d'un intérêt certain pour l'étude de l'action photodynamique par activation biphotonique puisqu'il présente un rendement faible ou nul en oxygène singulet, le rendant presque inactif en TPD conventionnelle. Ceci est une conséquence du paramagnétisme de l'ion métallique central Cu⁺⁺ qui rend la durée de l'état triplet relativement court. De plus, ce produit n'émet pas de fluorescence, conséquence de son bon rendement triplet, mesuré à 0.7 (McVie et al., 1978). Une mesure de fluorescence de ce composé, a été prise au spectrofluorimètre, confirmant l'absence de cette dernière.

L'étude photophysique détaillée de cette molécule a été faite dans notre laboratoire et la courbe d'absorption fondamentale et transitoire de ce Ps est illustrée dans la Figure II.2 (Fournier et al., 2003). Ainsi, avec le protocole pompe/sonde, il a été possible de sonder le comportement cinétique des états excités singulet et triplet, du CuPcS₄, durant leur processus de relaxation vers l'état fondamental.

Cette molécule pourrait être excitée à ²S₁ et à trois états triplets (Figure II. 1). Le temps de vie du triplet ⁴T₁ a été établi à 5 ns alors que les transitions ²S₁ → ²T₁ → ⁴T₁ se font dans un délai de 2.2 ± 0.2 ps et 400 ± 60 ps, successivement. Les valeurs des constantes de vitesse de premier ordre k₁, k₂, k₃, k₄, k₅ sont 2.0 ± 0.5, 460 ± 120, 2.3 ± 0.9, 2.5 ± 1.0 et 0.2 ± 0.1 (x 10⁹ s⁻¹), successivement. Ainsi pour induire une action à 2-γ, le délai entre les 2-γ devrait être autour de 5 ns. Le spectre d'absorption transitoire de la molécule CuPcS₄ a révélé que l'état excité triplet absorbe dans les intervalles 475-550 nm et 700-750 nm (Figure II.2). Puisque l'intensité d'absorption de l'état triplet est relativement plus grande autour de 520 nm et que la fluorescence T_n→T₁ de la molécule CuPcS₄ est située à 527 nm (Brozek-Pluska, et al., 2005), la bande d'absorption 475-550 nm a été exploitée.

Par contre, le Ps ZnPcS₄ a été choisi comme une molécule de référence à cause du diamagnétisme du métal central qui favorise la production de ¹O₂. De plus, ce Ps a un comportement photophysique (relaxation des états excités) et photochimique (production de radicaux dans un milieu hypoxique) similaire à du CuPcS₄ (Kaneko et al., 1995).

Les Pc (ZnPcS_3C_9 , AlPcS_2 et ZnPcS_4) ont été utilisés dans l'étude de la TPD à 2- γ (deux couleurs) grâce à leurs bonnes capacités de localisation et leurs fortes cytotoxicités (Cauchon et al., 2005; Allen et al., 1999). Cette dernière caractéristique est due à leur efficacité à davantage absorber les photons en grande quantité et à produire fortement les EOR ($^1\text{O}_2$). Ces Pc sont donc de meilleurs candidats pour le traitement de la DMLA par la TPD à 2- γ .

VI.1.2. Spectres d'absorption

Les spectres d'absorption des deux molécules, CuPcS_4 et ZnPcS_4 (20 μM), sont illustrés dans la Figure II.4. Dans l'eau, l'absorbance de la molécule ZnPcS_4 suit une allure caractéristique des Pc (Kaneko et al., 1995). La bande Q a deux maximums, le premier représente la partie monomère à 670 nm alors que le deuxième indique l'agrégation de la molécule à 640 nm. Dans le DMF, PBS (pH=7.4) ou le milieu de culture de la molécule, ZnPcS_4 , se monomérise provoquant ainsi une augmentation de la bande d'absorption à 670 nm et une diminution à 640 nm. Ce comportement est en concordance avec des résultats publiés précédemment (Howe et Zhang, 1998). Il a été démontré dans cette même étude qu'il y a un effet direct entre la formation des monomères et les états excités du ZnPcS_4 . Cela veut dire que la durée de vie des états excités augmente en se déplaçant de la forme agrégée vers celle du monomère. Ainsi, la présence de cette dernière forme joue un rôle primordial lors de la production de l'espèce réactive $^1\text{O}_2$.

La molécule CuPcS_4 a un comportement d'absorption similaire dans l'eau et le DMF, que le ZnPcS_4 . Ainsi, ses maximums d'absorption ont été observés dans l'eau à 630 nm et 650 nm avec un fort déplacement de la partie monomère à 675 dans le DMF (Kaneko et al., 1995). Toutefois, dans le milieu de culture et le PBS, le spectre d'absorption du CuPcS_4 diffère de façon substantielle par rapport au ZnPcS_4 . Ce dernier Ps se monomérise dans le PBS et le milieu de culture, alors que CuPcS_4 reste agrégé avec une perte de l'intensité d'absorption. Ce comportement peut être lié à l'effet pH (= 7.4) du milieu physiologique (PBS et milieu de culture). Dans les solutions aqueuses le CuPcS_4 a une tendance prononcée à former des dimères sous forme d'anneau empilé (polymères) (Abramczyk et Szymczyk, 2004).

L'agrégation de la molécule CuPcS_4 , dans le PBS et le milieu de culture, est causée par la forte interaction π - π (Schutte et al., 1993). Ceci est dû, en fait, à la composition aqueuse de ces deux solvants. Il est aussi connu que l'effet écran ionique induit par le sel réduit la répulsion entre

les charges des molécules de soluté. Cela provoque, même à faible concentration de sel (NaCl), une diminution du coefficient d'absorption molaire à 626 et 665 nm du CuPcS₄ (Camp et al., 2002). Puisque le PBS et le milieu de culture contiennent du sel, cela peut expliquer la diminution de l'intensité d'absorption du CuPcS₄ dans ces milieux.

VI.1.3. Production d'oxygène singulet

Les quantités de ¹O₂ produites après différentes conditions d'irradiation sont résumées dans le tableau II.1. Suite à l'irradiation avec une source laser CW à 670 nm, CuPcS₄ produit une faible concentration de ¹O₂. Au contraire, l'analogue ZnPcS₄ produit 36 fois plus de ¹O₂ sous les mêmes conditions expérimentales d'irradiation. Ceci est en accord avec des études précédentes conduites dans 30 % de méthanol/eau en utilisant le capteur L-tryptophane (Langlois et al., 1986), et dans le toluène en utilisant 2,2,6,6-tetramethylpiperidine (Maillard et al., 1980).

Ces résultats confirment que CuPcS₄ produit faiblement de l'¹O₂ par illumination monophotonique et aucunement par excitation biphotonique. Alors que ZnPcS₄ est un fort générateur de l'¹O₂ par les deux protocoles d'irradiation, avec une nette efficacité du processus à 1-γ (Table II.1).

Par ailleurs, la partie monomérique du CuPcS₄ est plus résistante à la photodégradation que ZnPcS₄ (Table II.1). Même après une durée d'irradiation prolongée allant jusqu'à 1 h avec une source laser CW à 670 nm ou pulsé à 532 nm, aucune dégradation du produit n'a été observée. Ceci suggère que la non-photodégradation de ce Ps, qui représente principalement des dommages oxydatifs, est directement relié à la non-capacité du CuPcS₄ à produire de ¹O₂.

La production de ¹O₂ par ZnPcS₄ a aussi été suivie en fonction de pO₂. La source utilisée est un laser monophotonique qui émet de la lumière à 670 nm en continu (Figure IV.2). La concentration de ¹O₂ diminue de façon constante au fur et à mesure que la pO₂ diminue. Au dessous de ~ 20 mmHg, ZnPcS₄ produit peu ou pas de ¹O₂.

VI.2. Étude de la TPD à deux photons (deux couleurs) sur l'ACE

Dans la présente étude, la méthodologie suivie consistait à irradier, par 2- γ continus (514 nm (183 mW/cm²) et 670 nm (86 mW/cm²)), de l'ACE incubé avec 90 μ M de CuPcS₄. L'activité de l'ACE a été mesurée par photométrie selon la méthode d'Ellman. Les résultats trouvés montrent que l'ACE pourrait être inactivé en combinant l'action de deux sources laser CW de longueur d'onde 514 et 670 nm dans un environnement aéré et en présence de CuPcS₄ (Figure III.4). L'incubation de l'ACE avec 90 μ M de CuPcS₄ durant 45 min dans l'obscurité n'a pas d'effet sur l'activité de l'enzyme. Ceci est en accord avec des observations précédentes faites par des chercheurs; ceux-ci ont découvert que la présence d'ions Cu⁺⁺ en forte concentration (≤ 100 μ M) n'affecte pas l'activité de l'ACE (Tomlinson et al., 1981). De plus, l'effet observé après irradiation, avec un et 2- γ , dépend de l'oxygène et de la présence du Ps. Cette dépendance à l'oxygène est consistante avec des rapports précédents dans lesquels l'ACE, incubé de RB, est irradié avec de la lumière impulsée (Lambert et al., 1996).

Dans un milieu aéré contenant CuPcS₄, l'activité de l'ACE diminue avec le temps d'irradiation (Figure III.4). Le mécanisme responsable de l'effet d'inactivation à 1- γ est probablement le type I puisque ¹O₂ ne pourrait être produit après irradiation avec de la lumière CW (514 ou 670 nm) à une longue période de temps (Table II.1). Ceci, à cause de la photodégradation de la partie monomère du CuPcS₄ après 45 min d'irradiation.

La forte inactivation causée par la lumière à 670 nm par rapport à 514 nm est reliée à l'absorption maximale de la longueur d'onde de la partie monomère du CuPcS₄ (Figure II.4). Les inhibitions causées par la somme des deux effets à 1- γ ((514) + (670 nm)) sont, significativement, moins que l'effet induit par la combinaison des deux lumières à 2- γ (514 + 670 nm) (Figure III.5), suggérant ainsi un mécanisme alternatif.

En utilisant l'une ou l'autre des procédures pour calculer l'activité de l'ACE, i.e. vitesse de production ou quantité totale de TNB, le protocole à 2- γ cause une inhibition additionnelle de 20 à 50% à cet enzyme par rapport de celui à 1- γ (Figure III.6).

Les données de l'absorption transitoire du CuPcS₄ (Figure II.2) indiquent l'abondance relative de l'état T₁ par rapport à S₀ avec un ratio de 2 :1 lors de l'irradiation simultanée (avec 514 et 670 nm). Puisque le coefficient molaire d'extinction des états excités T₁ (2×10^4 M⁻¹cm⁻¹) est ~13 fois plus grand que celui de S₀ (1.6×10^3 M⁻¹cm⁻¹) (valeurs estimées de la Figure II.2), on conclut que la compétition entre ces deux états est négligeable.

Ainsi, le mécanisme responsable de l'inhibition de l'ACE incubé de CuPcS₄ repose sur des produits toxiques issus de l'état excité T_n après excitation séquentielle de deux sources laser CW.

Bien qu'un effet photodynamique indépendant de l'oxygène est possible à partir des états excités supérieurs (Figure II.8) à forte concentration du Ps ou sous conditions anoxiques (Laustriat, 1986), l'inactivation de l'ACE suit un mécanisme différent pour produire des EOR.

Lors d'une étude faite par Kaneko et ses collègues, deux radicaux (CuPcS₄^{•-}, ZnPcS₄^{•-}) pourraient être produits par CuPcS₄ et ZnPcS₄ suite à une excitation biphotonique dans milieu anoxique (Kaneko, et al., 1995). D'après leur conclusion, ces deux radicaux pourraient infliger des effets toxiques envers les systèmes biologiques.

Le radical CuPcS₄^{•-} ne pourrait pas infliger des dommages directs à l'ACE à cause de deux contraintes. Premièrement, le site actif de l'enzyme est situé dans une gorge profonde à l'intérieur de la molécule, réduisant ainsi l'accès au substrat et les produits (Tõugu, 2001), ce qui limite la distribution du CuPcS₄^{•-} vu sa courte durée de vie (10 ns). Deuxièmement, la structure tridimensionnelle de l'ACE montre que le canal conduisant au site actif contient des charges ioniques négatives. Donc, par effet électrostatique seulement, les espèces cationiques ou neutres pourraient s'attirer vers la gorge de l'enzyme (Tõugu, 2001; Tan et al., 1993; Ripoll et al., 1993; Gilson et al., 1994). Par ailleurs, cette dernière contrainte pourrait expliquer pourquoi Smith et ses collègues ont observé l'inhibition de l'ACE du RBC incubé du RB (Smith et al., 1994). Ceci est dû en fait au radical cationique RB^{•+} produit et qui pourrait être attiré vers le site actif de l'ACE.

Cependant, le mécanisme indépendant de l'oxygène proposé (mécanisme de Type III) (Figure II.8) à 2- γ séquentiels pour infliger des dommages biologiques reste une possibilité qui exige d'autres investigations.

VI. 3. Étude de la TPD à deux photons (deux couleurs) sur les cellules Jurkat

VI.3.1. Les cellules Jurkat

Les cellules Jurkat sont des lignées cellulaires humaines (originellement appelé JM) établies vers la fin de 1977 à partir du sang périphérique d'un enfant de 14 ans atteint de tumeurs malignes de

lymphocytes T « T cell leukemia » (Schneider et al., 1977). Des dérivés différents de lignées cellulaires Jurkat peuvent être obtenus à partir de banc de culture cellulaire (American Type Culture Collection (ATCC)). Ces cellules sont des lymphocytes de type T immortalisé utilisés pour étudier les mécanismes cytotoxiques induits par les drogues et les radiations.

Ces cellules ont été étudiées en raison de trois facteurs :

(a) elles sont cultivées en suspension, ce qui est utile lors de leur transfert vers des cuvettes et l'irradiation par les sources laser; (b) ce sont des cellules cancéreuses humaines, donc on est plus près de la réalité; (c) les travaux de références, sur lesquels nos expériences sont basées, ont utilisé des cellules similaires comme entité biologique cible.

VI.3.2. Rétention cellulaire

Avant d'incuber les cellules Jurkat avec CuPcS₄, l'étude de la rétention cellulaire a été entamée. Toutefois, les techniques utilisées pour quantifier la quantité des drogues retenues par les cellules, exige la fluorescence des Ps à étudier. Cependant, le CuPcS₄ est une molécule non fluorescente. On a ainsi sélectionné le Ps fluorescent ZnPcS₄ comme référence pour prédire la cinétique de rétention cellulaire de son analogue CuPcS₄. La substitution du métal central Cu⁺⁺ par Zn⁺⁺ n'a pas d'effet sur la charge globale et l'hydrophilicité du Ps, qui sont les principaux facteurs qui déterminent la biodistribution du complexe phtalocyanine.

L'effet de la concentration du ZnPcS₄ et sa rétention par les cellules Jurkat ont été étudiés à différents temps d'incubation et les résultats sont présentés dans le Tableau II.2. La rétention intracellulaire du ZnPcS₄ augmente avec la concentration du Ps et le temps d'incubation. Le temps d'incubation atteint un niveau optimum à 24 h. Ce temps d'incubation a été fixé pour le reste de nos expériences. Ces observations sont en accord avec des résultats trouvés pour d'autres sortes de cellules : EAhy 926 et RIF-1 en utilisant *Raman mapping* (Freema et al., 1998) ou la microscopie à fluorescence (Cruse-Sawyer, 1996). Ces dernières études montrent qu'après être initialement capté par la membrane plasmique, le Ps se concentre principalement dans l'appareil Golgi.

VI.3.3. Excitation des cellules Jurkat dans un milieu aéré

VI.3.3.1. Excitation avec des photons en continu

Les résultats de la viabilité des cellules Jurkat (test MTT) après incubation par différents Ps à une concentration de 9 μM et exposition à la lumière infrarouge (660-700 nm) sont présentés dans la Figure II.5. Les deux Ps, ZnPcS₄ et ZnPcS₂, montrent une activité photodynamique très forte. Le Ps amphiphilique ZnPcS₂ a été inclus dans cette étude monophotonique comme référence, car les PcS₂ ont montré précédemment des fortes propriétés phototoxiques (Cauchon et al., 2005). Ceci est confirmé, dans la présente étude avec une mortalité induite à 100% sous une dose de 18 J cm⁻². Le dérivé ZnPc avec deux sulfones substitués sur deux anneaux (benzimidazoles) adjacents lui attribue une structure chimique particulière qui lui confère une bonne solubilité, tandis que les deux autres anneaux non substitués lui attribuent une hydrophobie indispensable pour pénétrer la membrane plasmique. L'amphiphilicité de ce composé disulfoné contribue majoritairement à son accumulation dans les cellules cibles et offre une phototoxicité maximale.

Sous les mêmes conditions, le Ps hydrophilique ZnPcS₄ a présenté 90% de mortalité. Cette molécule a quatre groupements sulfonés qui lui confèrent une très bonne solubilité, mais sa capacité à pénétrer la membrane plasmique est limitée. Ceci explique sa faible efficacité par rapport à ZnPcS₂.

Au contraire, en utilisant les mêmes conditions expérimentales, l'utilisation du CuPcS₄ comme Ps n'affecte pas la survie cellulaire et l'effet observé est le même que celui du contrôle. De plus, l'illumination avec une source laser CW à 514 nm n'a pas d'effet sur la viabilité cellulaire. Ces résultats confirment que, sous ces conditions d'irradiation, le CuPcS₄ ne produit pas de ¹O₂. De plus, l'absence de la TPD conventionnelle implique que CuPcS₄ pourrait contourner au moins en partie la photosensibilité dermique et oculaire que les autres Ps pourraient entraîner.

VI.3.3.2. Excitation avec des photons pulsés

La Figure II.6 illustre la viabilité cellulaire (test MTT) après irradiation de différents volumes de cellules Jurkat. La source utilisée est un laser impulsé à 532 nm avec un flux de 12.8 J cm⁻² et une concentration de CuPcS₄ de 60 μM . À un volume de 2 ml, la survie cellulaire était de 88.5±1.56% (p value = 0.0013) alors qu'en réduisant le volume à 1 ml, la survie cellulaire a

diminué à 81.3 ± 4.12 % (p value = 0.0008). Ainsi, il apparaît que le volume total de cellules irradiées a un faible effet sur la survie cellulaire, qui pourrait être reliée à différents facteurs comme l'agitation mécanique ou l'effet thermique. Pour vérifier la dernière hypothèse, la variation de la température du milieu de culture durant l'irradiation a été mesurée par une sonde thermique (Bailey *Instruments digital thermometer*, model Bat 8). La température de 1 ml augmente de 26°C à 28.9°C après 30 min d'irradiation alors que pour 2 ml, la température augmente de 26°C à 28.5°C durant la même période de temps. Cette faible augmentation de la température exclue l'effet thermique. Pour toutes les expériences qui suivent, 2 ml a été sélectionnée comme volume total à irradier. En variant la concentration du CuPcS_4 de 0-30 μM , après exposition à la lumière impulsée à 532 nm (17.6 J cm^{-2}) la viabilité cellulaire diminue puis se stabilise à $\sim 75\%$ (p value = 2×10^{-7}) à la concentration 15 μM (Figure II.7). L'augmentation de la concentration du Ps jusqu'à 30 μM n'affecte pas la viabilité cellulaire. La stabilisation de la phototoxicité pourrait être reliée à un nombre de facteurs incluant la saturation de cellules par le Ps (Table II.1) et la perte de la lumière thérapeutique due à l'auto absorption.

Pour confirmer qu'il y a une corrélation entre les viabilités mesurées par le test MTT et les survies cellulaires, des expériences ont été faites et évaluées par le test ETB. Pour ce faire, des cellules Jurkat ont été incubées avec deux concentrations de CuPcS_4 (30 μM et 60 μM) et irradiées avec un flux de 532 nm impulsé de 18.08 J cm^{-2} . La survie cellulaire a diminué de $89.7 \pm 3\%$ pour 30 μM de Ps à $80.2 \pm 6.38\%$ pour 60 μM Ps alors que pour le contrôle (sans lumière), la survie cellulaire a diminué de 96.2 ± 0.52 % à $95.4 \pm 2.34\%$, successivement. Ces résultats suggèrent que la mortalité cellulaire est causée probablement par des dommages de la membrane cellulaire, ce qui est en accord avec des observations reportées précédemment dans les ouvrages de référence utilisant le ZnPcS_4 (Cruse-Sawyer, 1996).

Les deux tests de survie cellulaire confirment que l'activité biphotonique provoque 10-20% de mortalité cellulaire ce qui est significativement grand par rapport aux résultats trouvés précédemment utilisant le RB comme Ps à 2- γ (Smith et al., 1994). Néanmoins le choix de CuPcS_4 comme Ps a des limitations reliées premièrement à son caractère hydrophilique qui limite sa rétention par les cellules, deuxièmement, à sa tendance à s'agréger sous condition physiologique, ce qui réduit sa phototoxicité (avec 1- γ et 2- γ) et finalement sa faible absorbance dans l'état fondamental à 532 nm. La dernière limitation pourrait être améliorée par la

combinaison de deux impulsions laser centrées à ~ 630 nm et à 532 nm. Ceci pourrait être une façon efficace d'obtenir le triplet T_1 et de favoriser la population de l'état triplet supérieur T_n .

VI.3.4. Excitation des cellules Jurkat dans un milieu hypoxique

Les évidences expérimentales et cliniques suggèrent que la fraction hypoxique dans les tumeurs solides peut réduire l'efficacité des traitements comme la radiothérapie, la photothérapie et certains agents anticancéreux (Chen et al., 2002). Par conséquent, il est important de développer une nouvelle modalité thérapeutique qui pourrait induire des mortalités cellulaires dans un milieu hypoxique.

Nos résultats de l'application de la TPD à 1- γ (670 nm) confirment les données des ouvrages dans lesquels l'oxygène moléculaire est obligatoire pour induire des effets cytotoxiques avec les Pc (Dougherty et al., 1998) et les HpD (Lee See, 1984; Moan et Sommer, 1985; Mitchell, el., 2008). Sous une pression d'oxygène de 40 mmHg, la génération de 1O_2 par ZnPcS₄ est largement réduite, atteignant un niveau indétectable en bas de 20 mmHg (Figure IV.2). Toutefois, une large fraction ($\sim 58\%$) de survie cellulaire a été mesurée après irradiation des cellules Jurkat, incubées de ZnPcS₄, par la source monophotonique (670 nm CW) à pO_2 de 20 mmHg (Figure IV.3a). Ces résultats suggèrent que 1O_2 n'est pas la seule espèce cytotoxique impliquée. Puisque les cellules Jurkat sont photoinactivées à des $pO_2 < 20$ mmHg, ceci implique la présence du mécanisme de type I. Le radical responsable de cette inactivation est peut-être l'anion radicalaire ZnPcS₄ $^{\bullet-}$.

Pour contourner la réduction importante de la photoinactivation observée à faible pO_2 (< 20 mmHg), deux protocoles d'irradiation biphotoniques ont été étudiés. L'irradiation avec une impulsion laser à 532 nm a été testée grâce à sa capacité à peupler l'état triplet supérieur T_n de ZnPcS₄ et CuPcS₄ (Kaneko et al., 1995). Ces chercheurs ont démontré le potentiel de ces deux derniers Ps à produire des radicaux anioniques à partir des états T_n suite à une excitation pulsée séquentielle dans un milieu hypoxique. Par ailleurs, la combinaison de deux sources laser à 532 et 670 nm améliore sélectivement l'excitation des Ps, ZnPcS₄ et CuPcS₄, de l'état excité T_1 vers l'état T_n .

L'hypothèse de base de cette partie d'étude est que l'utilisation des deux sources biphotonique (532 nm et 670 + 532 nm), induit des mortalités cellulaires faiblement dépendantes à l'oxygène que celle à 1- γ (670 nm).

Les résultats trouvés montrent que la photoinactivation des cellules Jurkat, incubées de ZnPcS₄ ou CuPcS₄, avec les deux protocoles d'irradiation biphotoniques, exige la présence d'oxygène (Figure IV.3).

En utilisant le Ps ZnPcS₄, qui est un bon générateur de ¹O₂, sous pression atmosphérique d'oxygène, l'habilité à induire des mortalités cellulaires, avec les deux sources combinées (532 et 532 + 670 nm), est la même que celle induite par le laser monophotonique à 670 nm.

Il est à noter que même à une pression d'oxygène inférieure à 20 mmHg, où la génération de ¹O₂ est inexistante, l'efficacité des deux protocoles mono et biphotonique est similaire (Figure IV.3).

Ces résultats suggèrent que l'addition de la lumière pulsée à 532 nm à celle à 670 nm, ne modifie pas l'habilité du ZnPcS₄ à induire des mortalités cellulaires. Ainsi, le mécanisme de type I est prédominant avec ces deux protocoles d'irradiation, même à faible concentration d'oxygène.

Au contraire, l'irradiation biphotonique, avec les deux sources laser combinés (532 + 670 nm), des cellules Jurkat incubées de CuPcS₄ dans un milieu aéré augmente la photoinactivation cellulaire par rapport à celle monophotonique à 670 nm. Puisque la molécule CuPcS₄, génère faiblement l'¹O₂, ces résultats suggèrent que la photoinactivation des cellules Jurkat suit un mécanisme de Type III (Figure II.8) complètement différent de ceux de type I et II. Cependant, l'efficacité de cette alternative d'irradiation nécessite la présence d'oxygène pour propager les dommages photoinduits (Figure IV.3b).

La source impulsée biphotonique à 532 nm, induit la même phototoxicité envers les cellules Jurkat incubées de CuPcS₄ ou ZnPcS₄ (Figure IV.3). Par ailleurs, puisque cette source laser réduit l'habilité du ZnPcS₄ et le CuPcS₄ à produire de ¹O₂ (Table II.1), on pourrait conclure que ce protocole d'irradiation suit un mécanisme différent de celui de Type II.

Dans le cas du ZnPcS₄, qui est un fort générateur de ¹O₂, la source monophotonique à 670 nm est plus efficace que celle biphotonique à 532 nm à induire des mortalités cellulaires. Au contraire, dans le cas du CuPcS₄, la source laser à 670 nm CW n'a aucun effet sur les cellules Jurkat, alors que celui impulsé à 532 nm produit un effet modeste mais statistiquement significatif.

Le spectre d'absorption transitoire de la molécule CuPcS₄ a révélé que l'état excité triplet absorbe dans les intervalles 475-550 nm et 700-750 nm (Figure II.2). Puisque l'exploitation de la première bande a permis de peupler les états excités supérieurs T_n et de causer des mortalités

cellulaires sans la présence de $^1\text{O}_2$, les sources laser qui émettent à 750 nm pourraient être utilisés. Ainsi, ceci sera avantageux de traiter des tumeurs situées dans des endroits plus profonds.

VI.4. Mécanisme d'excitation à deux photons (deux couleurs)

La photodestruction des cellules Jurkat avec des photons impulsés à 532 nm pourrait être un résultat de combinaison d'excitation à 2- γ séquentielle et simultanée du CuPcS₄. L'état triplet du CuPcS₄ absorbe autour de 532 nm (Fournier et al., 2003), et puisqu'à l'état fondamental la molécule du Ps absorbe faiblement à cette même longueur d'onde, alors les espèces cytotoxiques sont probablement produites à partir d'un état supérieur excité T_n via un mécanisme d'excitation séquentielle (Figure II.8, path 2). Par ailleurs, l'activation simultanée à l'état T_n pourrait avoir lieu directement via une CIS à partir de l'état S_n à travers un état excité virtuel S_i (Figure II.8, path 1). Les deux voies conduisent à la création d'espèces toxiques via un mécanisme décrit précédemment par Laustriat (Laustriat, 1986) comme un type III complémentaire aux types I et II qui caractérisent la TPD conventionnelle (Foote, 1991). Toutes les données consultées appuient la voie séquentielle prédominante. La CI très rapide $S_2 \rightarrow S_1$ est en compétition avec la CIS $S_2 \rightarrow T_n$, et puisque la transition $^2S_2 \rightarrow ^2S_1$ est plus rapide que la résolution temporelle de l'appareil ~ 210 fs (Nikolaïtchik et Rodgers, 1999), cela implique aussi que le CIS de l'état 2S_2 à l'état triplet supérieur visé soit pratiquement nul. Aussi la durée de vie de l'état excité S_n pour la transition électronique Q de l'anion (CuPcS₄)⁻ a été estimée être < 500 fs (Abramczyk et Szymczyk, 2004).

Cela nous mène à conclure qu'il n'existe qu'une seule voie d'excitation efficace, voire même possible, vers l'état triplet supérieur, soit le premier (Figure II.8, path 2) mécanisme Type III. Le produit cytotoxique formé via T_n est probablement l'anion radicalaire (CuPcS₄^{•-}), caractérisé par son maximum d'absorbance à 580 nm (Kaneko et al., 1995). Ce radical est produit par l'irradiation du CuPcS₄ dans un milieu aqueux anoxique avec 2- γ impulsés à 623 et 500 nm, successivement avec un délai de 10 μ s. Cette espèce a une durée de vie dans l'ordre de 10 ns, qui est deux fois la valeur du temps de vie de l'état T_1 (5 ns) estimé précédemment. Ce radical n'est pas détecté suite à l'irradiation avec 1- γ dans le visible (Kaneko et al., 1995).

Les travaux futurs concernant cette première partie, consisteront, dans un premier temps, à élaborer des molécules ayant des propriétés de concentration intracellulaire meilleures que

CuPcS₄. La synthèse d'une molécule semblable à deux sulfones pourrait améliorer l'internalisation cellulaire de cette molécule et ainsi induire une bonne photocytotoxicité. Le problème que nous avons eu lors de l'étude de la quantification de la rétention cellulaire du CuPcS₄ est que cette molécule n'émet aucune fluorescence. Marquer ce Ps avec une entité fluorescente, non toxique et qui n'a pas d'effet photodynamique, pourrait remédier à ce problème.

L'étude faite sur l'enzyme ACE a révélé la capacité des sources laser continus à exciter de façon séquentielle le CuPcS₄ vers des états excités supérieurs. Ceci prouve la grande efficacité de ce protocole, car puisque la durée de vie de l'état triplet est autour de 5 ns, alors la probabilité qu'une source laser en continu ré-excite cet état est très faible. La même chose pourrait être dite pour le deuxième protocole d'irradiation à 2- γ avec la source laser impulsé à 532 nm. Ainsi, bien que l'état fondamental absorbe faiblement à 532 nm, on est arrivé à peupler l'état excité supérieur T_n et à induire des mortalités cellulaires à l'intérieur d'une impulsion de 8 ns.

L'excitation du CuPcS₄ avec deux impulsions laser centrées en nanosecondes à 532 et 670 nm pourrait améliorer le protocole biphotonique séquentiel de façon à peupler efficacement l'état triplet T_n supérieure.

VI.5. Étude de l'absorption à deux photons (une couleur)

La DMLA est une maladie de l'oeil qui touche le centre de la macula, une place nommée la fovéa, une petite zone située au centre de la rétine, responsable de l'acuité visuelle. Cette maladie maculaire atteint les personnes de plus de 50 ans en occident et entraîne une perte progressive ou rapide de la vision centrale. Elle peut également se manifester chez les jeunes. La TPD conventionnelle est le seul traitement qui existe actuellement pour stabiliser la DMLA. Cette dernière modalité est limitée par la faible spécificité du Ps conduisant aux dommages des tissus sains adjacents à ceux qui représentent la cible pathologique. De plus, le régime d'irradiation utilisé pourrait causer des dommages latéraux aux tissus sains avoisinants (Samkoe et al., 2007).

Ces dommages pourraient être réduits au minimum, voire éliminés, si le thérapeute pouvait cibler le tissu malade avec plus de précision. Récemment, l'excitation à 2- γ de Ps a été examinée comme étant une méthode d'irradiation alternative à celle déjà utilisée, consistant à 1- γ . L'utilisation de l'excitation simultanée à 2- γ par des impulsions laser ultrarapides dans le

proche infrarouge (longueur d'onde=780-900 nm) permettra de finement diriger le rayon laser et de le localiser dans une surface tridimensionnelle. Ces propriétés sont issues du mécanisme d'interaction non-linéaire qui fait en sorte que la probabilité du procédé biphotonique dépende du carré de l'intensité de la source laser au point focal. Ainsi, un volume dans l'ordre de femtolitres (10^{-15} litre) (Samkoe, et al., 2007; Karotki, et al., 2006) pourrait être traité, une précision de l'ordre d'une cellule. D'autre part, l'utilisation de photons dans le NIR permet à la lumière de traverser le tissu sain de façon inoffensive et de pénétrer dans les cellules qui auront capté le Ps. Ce n'est qu'au foyer d'un rayon d'une source laser hautement focalisé que le Ps sera suffisamment activé pour détruire la cellule endommagée, laissant le tissu sain avoisinant intact. Une telle stratégie nous permettrait d'éliminer les dommages indirects et le patient aurait plus de chances à retrouver la vue. Le Photofrin et le Verteporfin ont été testés dernièrement comme Ps pour démontrer la faisabilité du principe de la TPD à 2- γ in vitro sur des cellules endothéliales. L'occlusion complète de vaisseaux sanguins dans un modèle membranaire chorioallantoïdienne du poulet a aussi été démontrée avec le Verteporfin. Cependant, ces deux Ps ont l'inconvénient d'être moins sélectifs envers les cellules pathologiques et ils ont une faible capacité d'absorber les photons émis par les sources laser utilisés en TPD.

Par conséquent, il est important de développer un nouvel agent thérapeutique qui pourrait traiter efficacement la DMLA par la TPD sans effets secondaires. Dans cette étude, la σ_2 d'absorption à 2- γ , ainsi que le rendement quantique de fluorescence ont été évalués pour une série de Pc en utilisant successivement la méthode de référence et comparative.

Nos résultats montrent que la valeur Φ_F du Photofrin est aussi faible dans le PBS que dans le méthanol. Pour les Pc, les valeurs de Φ_F dans le méthanol sont faibles par rapport à celles dans le DMSO (Table V.1). Les faibles valeurs de fluorescences des Pc sulfonés dans le méthanol sont causées par la tendance de ces molécules à agréger dans les solvants polaires. L'agréation réduit la probabilité des processus radiatifs (fluorescence) ce qui est dû à la complexité de la structure de ces molécules qui fait ouvrir d'autres canaux non radiatifs. La forte valeur de Φ_F pour les complexes ayant l'aluminium comme métal de base par rapport aux autres molécules complexées avec le zinc semble être une conséquence de la taille de ce dernier. Ainsi avec un métal de base de grande taille, les Pc font des CIS vers le triplet plutôt que de fluorescer (Williams, et al., 1983). Dans le cas du Photofrin, le faible rendement de fluorescence dans le PBS est dû à

l'agrégation de ce composé, ce qui concorde avec des résultats précédemment publiés (Smith, 1985).

La σ_2 d'absorption à 2- γ a été mesurée à 800 nm, une longueur d'onde dans laquelle les Pc et les Photofrin n'absorbent pas (Figure V.4). Ainsi, la contribution de la TPD à 1- γ est négligeable.

Il faut signaler que la méthode de référence utilisée (chapitre V, équation (2)) est basée sur la connaissance au préalable de la valeur de la σ_2 d'absorption à 2- γ de la molécule de la référence Rh6G. Cependant, les valeurs publiées du Rh6G à la longueur d'onde d'excitation 800 nm (Tableau VI.1) varient énormément (Mathai, et al., 2007). Ceci rend le choix d'une valeur à adopter difficile. On a pris 134 GM comme valeur de référence, car elle a été estimée dans des conditions expérimentales proches à la nôtre.

Tableau VI.1 La σ_2 d'absorption à 2- γ pour le Rh6G dans le méthanol mesuré à ~ 800 nm

Σ_2/GM	Méthodes	Concentration	Répétition	Énergie	Référence
~ 30	TPIF	110 μM	82 MHz	$\sim \text{nJ}$	(Sengupta, et al., 2000)
243.5	TPIF	10^{-5} - 10^{-3}	82 MHz	$\sim \text{nJ}$	(Albota et al., 1998)
16.2	NLT	10.23 mM	10 Hz	0.6 mJ	(Fischer et al., 1995)
134	TPIF	0.326 μM	100 Hz ^b	10 nJ-200 μJ	(Oulianov et al., 2001)
12.8	NLT	0.233 mM	Single pulse ^b	10 nJ-200 μJ	(Oulianov et al., 2001)
6.4(2.9) ^a 4.2(2.8) ^a	Fluor. Saturation	1 μM	250 kHz	$\sim \text{nJ}$	(Connor et Philips, 1984)

a = $\sigma_{2\text{sat}}$, b = Picoseconde pulsed used

TPIF = Two photon induced fluorescence

NLT = Non linear transmission

La plupart des tetrapyrroles (Photofrin, HpD and Protoporphyrin IX) ont une σ_2 dans l'ordre de 2-10 GM. Par exemple, la σ_2 du HpD (10^{-3} - 10^{-4} M dans le méthanol) à 800 nm est 10.7 GM avec une concentration de la référence Rh6G à 10 mM (Mathai, et al., 2007). Alors que celle du protoporphyrin IX (10^{-5} M dans l'éthanol pour le Ps et la référence Rh6G) à 790 nm, a été estimée à 2.0 GM (Goyan et Cramb, 2000). En utilisant un microscope laser à balayage, une valeur de 10 GM de σ_2 a été obtenue pour le Photofrin (100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ dans le méthanol) à $\lambda_{\text{exc}} = 800$ nm (Karotki, et al., 2006).

La valeur de la σ_2 du Photofrin dans la présente étude est 9.3 GM, ce qui est en accord avec les valeurs rapportées dans la littérature (Table V.2). Dans le cas des Pc, AlPcCl, AlPcS_{2adj}, ZnPcS_{3C9} et ZnPcS₄ ont des sections efficaces plus grandes que le Photofrin (Table V.2). Les études théoriques, entre les Pc et les tetrabenzoporphyrins, suggèrent que la différence de valeur de σ_2 entre ces deux Ps est peut-être due aux larges transferts de charge intramoléculaire entre les états excités supérieurs des phtalocyanines (Zhou et al., 2004).

Il faut signaler qu'à travers les Pc étudiés dans ce projet, le ZnPcS₄ est le plus efficace Ps pour la TPD à 2- γ . Ainsi, les Pc à base de zinc avec quatre sulfones sur les anneaux périphériques donnent une σ_2 la plus élevée (~85 GM) alors que les autres Pc (AlPcCl, AlPcS_{2adj} et ZnPcS_{3C9}) ont donné des valeurs 33.34, 37.18 et 36.24, successivement. Ces trois derniers Pc ont une capacité d'absorption à 2- γ à peu près quatre fois plus grande que celle du Photofrin.

La raison pour laquelle ZnPcS₄ est plus efficace est peut-être due à deux principales considérations. Premièrement, la substitution du ZnPcS₄ par quatre groupes sulfones chargés négativement pourrait augmenter fortement les transitions à 2- γ (Drobizhev, 2006). Deuxièmement, pour les molécules ayant un centre de symétrie, les règles de sélections pour les transitions à un et 2- γ sont mutuellement exclusives. Ainsi, les transitions à 1- γ arrivent entre les états avec différentes parités ($g \rightarrow u$ or $u \rightarrow g$), alors que les transitions à 2- γ sont permises entre les états de mêmes parités ($g \rightarrow g$ or $u \rightarrow u$) (Karotki, et al., 2003).

On a aussi découvert que dans les porphyrines centrosymétriques, il y a des transitions à 2- γ permises qui couplent les parités (g) de l'état fondamental aux états excités ayant la même parité ($g \rightarrow g$ transition). Les calculs placent cette forte transition à 2- γ interdite proche de la transition Soret permise à 1- γ , ce qui suggère que, si la fréquence de la source laser est réglée à 700-800 nm, la σ_2 d'absorption à 2- γ augmentera de façon significative (Karotki, et al., 2003). Par ailleurs, d'autres résultats expérimentaux confirment que la présence du centre d'inversion dans les matériaux joue un rôle crucial dans les propriétés d'absorption à 2- γ (Kim, et al., 2000).

La relation entre l'intensité de fluorescence et l'intensité d'excitation a été suivie pour tous les Ps étudiés et le résultat démontre que cette dépendance est quadratique (Figure VI.1). Ceci prouve que les valeurs mesurées sont bel et bien dues à un concept biphotonique simultané. Les valeurs mesurées pour le Photofrin et AlPcS₂ sont proches à celles publiées (Meshalkin et Chunosova, 2005; Karotki, et al., 2006).

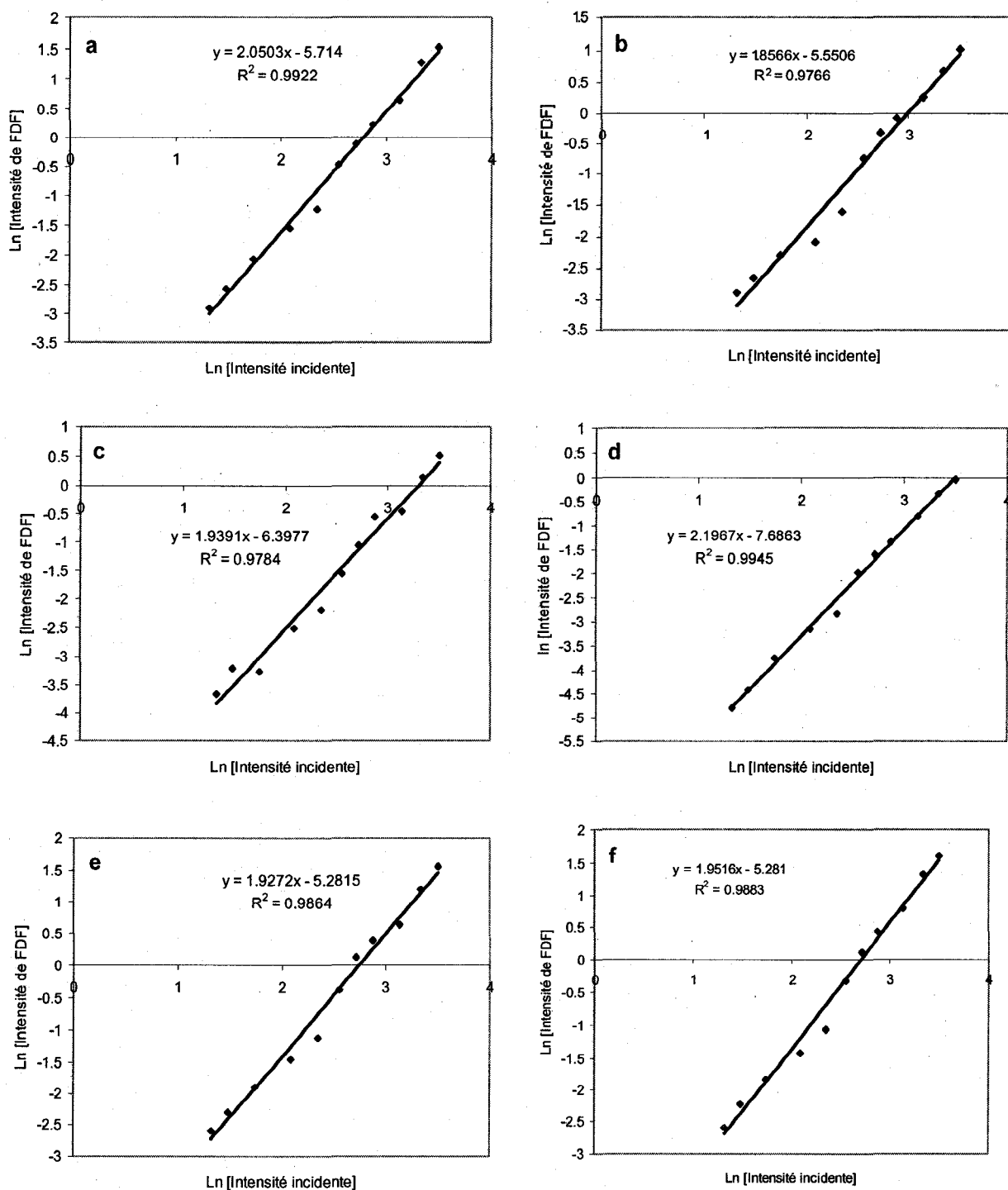


Figure VI.1 Courbe Ln-Ln de l'intensité de fluorescence à deux photons (FDF) en fonction de l'intensité d'excitation incidente pour a) Rh6G, b) AlPcCl, c) AlPcS_{2adj}, d) Photofrin, e) ZnPcS₄ and f) ZnPcS₃C₉

Beaucoup d'étude de la propriété d'absorption à 2- γ ainsi que de mesures de la σ_2 ont été entamées sur beaucoup de chromophores de type porphyrine et autre (Tableau VI.1). Par contre, les propriétés d'absorption à 2- γ des Pc, les Ps de deuxièmes générations les plus étudiées, restent jusqu'à date perplexes. Seulement deux groupes ont entamé des mesures expérimentales directes : Meshalkin et Chunosova ont obtenu une valeur de 540 GM à $\lambda_{ex} = 800$ nm pour un mélange de AlPcS₂₋₄ (Meshalkin et Chunosova, 2005); Drobizhev et ses collègues ont trouvé des valeurs relativement faibles 75-200 GM at $\lambda_{ex} = 1180-1550$ nm (Drobizhev et al., 2006) pour des molécules symétriques qui varient par le type, la position (α or β) et le nombre de substitués (4, 8 or 16), ainsi que le type du métal de base (Al³⁺ or Zn²⁺).

Tableau VI.2 La σ_2 d'absorption à 2- γ pour différents Ps (Karotki et al., 2006)

	σ_2 , GM	Longueur d'onde, nm	
Photofrin	7.4	850	Ps couramment utilisé en TPD à 1- γ
HpD (Bodaness et al., 1986)	15	750	
HMT (Oh et al., 1997)	20	730	
AlPc (Meshalkin et al., 1999)	12.7	1064	
Photosens (Meshalkin et al., 1999)	5	1064	
PPIX (Goyan et Cramb, 2000)	2	790	
Hypocrellin A (Liu et al., 2002)	34.8	800	
Hypocrellin B (Liu et al., 2002)	21.3	800	
Photolon (Kruk et al., 2003)	60	800	
Chlorin-e6 (Chen et al., 2005)	29.1	800	
ZnOEP (Drobizhev et al., 2002a)	4.4	780	Porphyrins
H2TPP (Drobizhev et al., 2002a)	15	780	
H2TBP (Drobizhev et al., 2002a)	20	780	
ZnMPTBP (Drobizhev et al., 2002a)	67	780	
ZnDiPTBP (Drobizhev et al., 2002a)	50	780	
ZnTriPTBP (Drobizhev et al., 2002a)	130	780	
ZnTPTBP (Drobizhev et al., 2002a)	90	780	
Bu4TAP (Drobizhev et al., 2002b)	70	783	
(BrPh)8TAP (Drobizhev et al., 2002b)	380	802	
(NO2Ph)8TAP (Drobizhev et al., 2002b)	900	802	
Porphyrin+stilbene (Spangler et al., 2004; Drobizhev et al., 2003)	110-880	795	Nouveau Ps à 2- γ
Porphyrin dimers (Drobizhev et al., 2004)	3100-10100	825-875	

La valeur trouvée dans notre étude (85 GM) est proche de celles publiées par le deuxième groupe de chercheurs. La raison pour laquelle leurs valeurs dépassent la limite (100 GM) requise pour avoir un effet efficace à 2- γ (Karotki et al., 2006), est que les longueurs d'onde d'excitation utilisées (1180-1550 nm) sont proches de la résonnance des Pc à $\lambda_{ex}/2$.

Les résultats de notre étude montrent qu'il y a une relation entre la structure chimique des Ps et la σ_2 d'absorption à 2- γ . Elle fournira ainsi des données physico-chimiques qui permettront le développement de nouveaux Ps avec des capacités d'absorption à 2- γ plus grandes.

L'efficacité de la molécule ZnPcS₄ a été déjà évaluée par Huang et ses collègues. Ils ont observé, par microscopie à fluorescence, que cette molécule se concentre sélectivement sur les choriocapillaires et les néovaisseaux croidal (CNV) (Huang et al., 2007). Ils ont obtenu comme résultats que la TPD monophotonique par ZnPcS₄ induit une occlusion complète de CNV avec un minimum de dommage aux cellules de la rétine adjacentes. Les études histologiques faites par ces chercheurs, par « light and electron microscopy », démontrent la nécrose des cellules endothéliales des CNV avec des dommages minimaux aux tissus adjacents.

Ces résultats combinés à ceux trouvés dans notre étude prouvent le potentiel des phtalocyanines en général et ZnPcS₄ en particulier comme candidats pour le traitement de la DMLA.

Les travaux futurs concernant la deuxième partie, consisteront dans un premier temps, à étudier les propriétés biphotoniques de Phtalocyanines ayant différentes symétries moléculaires. Ceci a pour objet de faire la relation entre la structure chimique des Pc et la σ_2 d'absorption à 2- γ . Cette étude pourrait éventuellement éclaircir ou consolider les deux contraintes citées ci-dessus à propos de l'efficacité du ZnPcS₄ par rapport aux autres phtalocyanines.

Par ailleurs, le développement d'autres stratégies moléculaire afin d'obtenir de nouveaux matériaux possédant une large σ_2 serait intéressant, sachant que, l'augmentation de la longueur de conjugaison de la molécule, ou l'augmentation du transfert d'électrons entre les parties périphériques de la molécule et son centre, ou *vice versa*, entraînent une forte augmentation de la valeur de la σ_2 d'absorption à 2- γ , ainsi qu'un déplacement vers les grandes longueurs d'onde de la bande d'absorption à 2- γ , par rapport aux molécules courtes (Kotler et al., 2000).

Les mesures faites de la fluorescence à 2- γ ont été issues d'une excitation par une source laser Ti-Sapphire qui émet de la lumière à 800 nm. Une mesure à différente longueur d'onde (780-900 nm) pourrait nous informer sur la localisation, dans le spectre d'absorption, de la valeur maximale de la section d'absorption à 2- γ . Ceci pourrait optimiser les valeurs déjà mesurées.

D'autre part, des mesures de toxicité de ce procédé pourraient éventuellement être faites sur des biomolécules ou sur des cellules cancéreuses. Vu des considérations pratiques liées au volume extrêmement petit au point focal, l'utilisation de cellules adhérentes serait convenable.

CHAPITRE VII. CONCLUSION

L'objet de ce projet était le développement d'une méthode expérimentale in vitro qui nous permettra d'étudier la faisabilité de la TPD à 2- γ . Deux protocoles biphotoniques ont été étudiés; le premier est basé sur une excitation séquentielle pour traiter des tumeurs cancéreuses alors que le deuxième est un concept d'excitation simultané pour remédier à la DMLA.

La méthodologie suivie dans la première partie consistait à irradier, par 1- γ et 2- γ , deux entités biologiques (cellules et enzymes) incubées de CuPcS₄. Ce Ps est un phtalocyanine contenant un ion métallique central paramagnétique, ce qui limite sa capacité à générer de ¹O₂ via le mécanisme de type II. Cette étude a été effectuée dans deux environnements, une, sous une pression d'oxygène atmosphérique alors que le deuxième dans un milieu complètement anoxique.

L'excitation de cette molécule de Ps vers un état triplet supérieur via une activation biphotonique l'amène à un état où elle pourrait jouir d'une chimie plus riche et indépendante de l'oxygène dans son retour à l'état fondamental. La méthodologie suivie consistait à irradier, par l'entremise de 2- γ , des cellules cancéreuses Jurkat (*Human T-lymphocyte*) incubées de CuPcS₄. La source utilisée est un laser Nd:Yag qui produit des impulsions monochromatiques de longueur d'onde 532 nm et des délais de 8 ns équivalents à la durée de vie du triplet de CuPcS₄. Les résultats trouvés montrent que le concept de l'application de la TPD à 2- γ sur des cellules cancéreuses est faisable et la photophysique est bel et bien reproductible dans un milieu plus complexe, à savoir le milieu cellulaire. Avec notre concept, on est arrivé à causer 20% de mortalité cellulaire sans l'apport de ¹O₂. Celle-ci a été quantifiée par le test de survie cellulaire

MTT puis confirmée par un autre test de survie cellulaire microscopique (*Trypan Blue Exclusion*).

Dans le cas de l'enzyme, l'irradiation de l'ACE en présence de CuPcS₄ par 2- γ induit une inhibition significative de l'enzyme (20-50%) par rapport à l'effet d'un seul photon. Cette inhibition n'a pas été observée en présence du CuPcS₄ ou de la lumière seule. Les dommages observés, ne dépendent donc pas de ¹O₂ et ils augmentent linéairement avec la dose. Ces résultats montrent que le concept de la TPD à 2- γ fonctionne sur l'ACE, en accord avec les données photophysiques de la molécule de CuPcS₄.

Pour déterminer le potentiel de cette méthode, des cellules cancéreuses Jurkat incubées du CuPcS₄ ou ZnPcS₄ ont été irradiées par un système à 1- γ et 2- γ dans un milieu hypoxique. Le Ps à base de zinc est, relativement, un bon générateur de ¹O₂, alors que celui à base de cuivre ne l'est pas. Le système à 1- γ utilisé est une source laser en continu émettant de la lumière à 670 nm. Pour l'irradiation à 2- γ , une source laser impulsée à 532 nm seul ou combiné avec celui à 670 nm a été utilisé. Les résultats montrent que l'efficacité, à 1- γ et 2- γ , des deux Ps à photoinactiver les Jurkat diminuent avec l'appauvrissement de l'oxygène. Nos résultats suggèrent que pour CuPcS₄, l'état excité T_n peut être peuplé par irradiation à 2- γ avec les sources laser 532 nm ou 532 nm combinés à 670 nm. La dépendance de la photocytotoxicité aux conditions aérobiques pour la TPD à 2- γ suggère que l'espèce cytotoxique est dérivée de l'oxygène. Ceci est en accord avec l'hypothèse que ¹O₂, et/ou ses dérivés radicaux, joue un rôle primordial dans la TPD à 1- γ et 2- γ . Cela veut dire que la TPD à 2- γ pourrait contourner, du moins en partie, les limites de la TPD conventionnelle reliées à l'hypoxie des tumeurs. Dans le cadre de cette recherche, nous avons aussi adapté un nouveau protocole d'irradiation des cellules dans un milieu dont le niveau d'oxygène pouvait être finement régulé.

La deuxième partie de ce projet de recherche visait à déterminer le potentiel de nouveaux Ps comme agent actif pour la TPD à 2- γ pour le traitement de DMLA. Bien que les premiers essais cliniques aient démontré que la TPD à 1- γ bloquait la progression de la maladie, son application ne permet pas aux patients de retrouver la vision perdue. Cette limite serait reliée aux dommages indirects causés aux tissus sains avoisinants à cause de la diffusion du faisceau lumineux et de la faible spécificité des Ps. Ces inconvénients pourraient être réduits au minimum, voire éliminés, si le thérapeute pouvait cibler le tissu malade avec plus de précision. La TPD à 2-

γ représente une alternative potentielle. Ainsi, avec des impulsions laser ultrarapides dans le proche infrarouge, la lumière pourrait traverser le tissu sain de façon inoffensive et attaquer les cellules pathologiques ayant capté le Ps.

La méthodologie suivie dans cette partie consiste, dans un premier temps, à mesurer la σ_2 à 2- γ du Photofrin pris comme référence ainsi qu'une série de Pc connue par leur efficacité en TPD monophotonique. Nous proposons d'utiliser des Ps de type phtalocyanine, car ils ont démontré une bonne capacité de localisation et une forte cytotoxicité. Le système d'irradiation à 2- γ utilisé est un Ti-Saphir (laser femtoseconde) émettant de la lumière à 800 nm.

Les résultats trouvés démontrent que la structure chimique des phtalocyanines joue un rôle primordial dans le processus d'absorption à 2- γ . Ainsi, les Pc à base de zinc avec quatre sulfones sur les anneaux périphériques donnent la σ_2 la plus élevée (~ 85 GM) ($1 \text{ GM} = 10^{-50} \text{ cm}^4 \text{ s}$) alors que les autres Pc ont donné une valeur de ~ 35 GM. Pour le Photofrin la valeur de la σ_2 (9.3 GM) est relativement faible par rapport aux Pc. Ces résultats prouvent l'efficacité des Pc à l'excitation biphotonique par rapport au Photofrin et fourniront des données physico-chimiques qui permettront le développement de nouveaux Ps avec des valeurs de σ_2 plus grandes.

RÉFÉRENCES

1. Abramczyk H., Szymczyk I. (2004) Aggregation of phthalocyanine derivatives in liquid solutions and human blood. *J. Mol. Liquids*, 110, 51-56.
2. Ackermann G., Abels C., Baumler W., Langer S., Landthaler M., Lang E.W., Szeimies R.M. (1998) Simulations on the selectivity of 5-aminolaevulinic acid-induced fluorescence in vivo. *J. Photochem. Photobiol. B: Bio.*, 47, 121-128.
3. Agarwall M. L., Clay M. E., Harvey E. J., Evans H. H., Antune A. R., Oleinick N. L. (1991) Photodynamic therapy induces rapid cell death by apoptosis in L5178Y mouse lymphoma cells. *Cancer Res.*, 51, 5993-5996.
4. Ake R. L., Gouterman M. (1969) Porphyrins XIV. Theory for the Luminescent State in VO, Co, Cu Complexes. *Theoret. Chim. Acta (Berl.)*, 15, 20-42.
5. Ali H., Langlois R., Wagner J. R., Brasseur N., Paquette B., vanLier J. E. (1988) Biological activities of phthalocyanines-X. Syntheses and analyses of sulfonated phthalocyanines. *Photochem. Photobiol.* 47, 73-77.

6. Allen C. M., Sharman W. M., La Madeleine C., weber J. M., Langlois R., Ouellet R., van Lier J. E. (1999) Photodynamic therapy: tumor targeting with adenoviral proteins. *Photochem. Photobiol.*, 70, 512-523.
7. Allen C. M., Sharman W. M., van Lier J. E., (2001) Current status of phthalocyanines in the photodynamic therapy of cancer. *J. Porphyrins Phthalocyanines*, 5, 161-169.
8. Allen C. M., Sharman W. M., van Lier J. E. (2001) Current of phthalocyanines in the photodynamic therapy of cancer. *J. Porphyrins Phthalocyanines*. 5, 161-169.
9. Allen M. T., Lynch M., Lagos A., Redmond R. W., Kochevar I. E. (1991) A wavelength dependent mechanism for rose bengal-sensitized photoinhibition of red cell acetylcholinesterase. *Biochim. Biophys. Acta*, 1075, 42-49.
10. Allison R. R., Mota H. C., Sibata C. H., (2004b) Clinical PD/PDT in North America an historical review. *Photodiag. Photodyn. The.* 1, 263-277.
11. Allison R. R., Downie G. H., Cuenca R., Hu X. -H., Childs C. J. H., Sibata C. H. (2004) Photosensitizers in clinical PDT. *Photodiag. Photodyn. The.*, 1, 27-42.
12. Albota M. A., Xu C., Webb W. W., (1998) Two-Photon Fluorescence Excitation Cross Sections of Biomolecular Probes from 690 to 960 nm. *Appl. Optics*, 37, 7352-7356.
13. Andreoni A., Cubeddu R., De Silvestri S., Laporta P., Svelto O., (1982) Two-step laser activation of hematoporphyrin derivative. *Chem. Phys. Lett.*, 88, 37-39.
14. Andreoni A. (1987) Two-step photoactivation of hematoporphyrin by excimer-pumped dye-laser pulses, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, 1, 181-193.
15. Atilgan S., Ekmekci Z., Dogan A. L., Guc D., Akkaya E. U., (2006) Water soluble distyryl-boradiazaindacenes as efficient photosensitizers for photodynamic therapy. *Chem. Commun.*, 4398-4400.
16. Aubry J. M., Rigaudy J., Cuong N. K., (1981) A Water-Soluble Rubrene Derivative Synthesis, Properties and Trapping of $^1\text{O}_2$ in Aqueous Solution, *Photochem. Photobiol.*, 33, 149-153.
17. Auler H., Banzer G. (1942) Untersuchungen uber die Rolle der Porphyrine bei geschwulstkranken Menschen und Tieren. *Z. Krebsforsch.*, 53, 65-68.
18. Bachor R., Shea C. R., Belmonte S. J., Hasan T. (1991a) Free and conjugated chlorin E6 in the photodynamic therapy of human bladder carcinoma cells. *J. Urol.*, 146, 1654-1658.

19. Bachor R., Shea C.R., Gillies R., Hasan T. (1991b) Photosensitized destruction of human bladder carcinoma cells treated with chlorin e6-conjugated microspheres. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 88, 1580-1584.
20. Bauer C. (1990) Hypoxia: on the borderline between physiology and pathophysiology. A foreword. *Experientia.*, 46, 1157-1160.
21. Belcourt M. F., Lin X. K., Zheng L. -m., Du J., Wang Q., Song L. B., Liu L., Nassar A., Clairmont C., King I., (2005) Selective Killing of Hypoxic Tumor Cells by Water Soluble Analogs of 1,2-bis(methylsulfonyl)-1-(2-chloroethyl)-2-[[1-(4-nitrophenyl)ethoxy]carbonyl]hydrazine (KS119) Vion Pharmaceuticals, Inc., 4 Science Park, New Haven, CT 06511. 229th ACS National Meeting San Diego, CA
22. Bellnier D., Ho K., Pandey R. K., Missert J., Dougherty T. J. (1989) Distribution and elucidation of the tumor-localizing component of hematoporphyrin derivative in mice. *Photochem. Photobiol.*, 50, 221-228.
23. Ben-Hur E., Rosenthal I. (1986) Action spectrum (600-700 nm) for chloroaluminum phthalocyanine-induced phototoxicity in Chinese hamster cells. *Laser Life Sci.*, 1, 79-86
24. Ben-Hur E., Rosenthal I., (1985) Photosensitized inactivation of Chinese hamster cells by phthalocyanines. *Photochem. Photobiol.*, 42, 129, 1985.
25. Ben-Hur E., Moor A. C., Margolis-Nunno H., Gottlieb P., Zuk M. M., Lustigman S., Horowitz B., Brand A., van Steveninck J., Dubbelman T. M., (1996) The photodecontamination of blood components: mechanisms and use of photosensitization in transfusion medicine. *Transfus. Med. Rev.*, 10, 15-22.
26. Ben-Hur E., Horowitz B., (1995) Advances in photochemical approaches for sterilization. *Photochem. Photobiol.*, 62, 383-388.
27. Ben-Hur E., Oetjen J., Horowitz B., (1997) Silicon phthalocyanine Pc 4 and red light causes apoptosis in HIV-infected cells, *Photochemistry and photobiology*, 65, 456-460.
28. Berg K., Moan J., Bommer J. C., Winkelman J. W. (1990) Cellular inhibition of microtubule assembly by photoactivated sulphonated meso-tetraphenylporphines. *Int. J. Radiat. Biol.*, 58, 475-487.
29. Bodaness R. S., D. F. Heller, J. Krasinski, D. S. King (1986) The two-photon laser-induced fluorescence of the tumor-localizing photosensitizer hematoporphyrin derivative.

- Resonanceenhanced 750 nm two-photon excitation into the near-UV Soret band. *J. Biol. Chem.* 261, 12098-12101.
30. Brasseur N., Ali H., Autenrieth D., Langloi R., van Lier J. E. (1985) Biological activities of phthalocyanines III. Photoinactivation of V-79 Chinese hamster cells by tetrasulfophthlacyanines. *Photochem. Photobiol.*, 42, 515-521.
 31. Brasseur N., Ali H., Langlois R., van Lier J. E. (1988) Biological activities of of phthalocyanine. IX. Photosensitization of V-79 Chinese hamster cells and EMT-6 mouse mammary tumor by selectively sulfonated zinc phthalocyanines. *Photochem. Photobiol.*, 47, 705-711.
 32. Brozek-Pluska B., Szymczyk I., Abramczyk H. (2005) Raman spectroscopy of phthalocyanines and their sulfonated derivatives, *J. mol. Struct.*, 744-747, 481-485.
 33. Bugelski P. J., Porter C. W., Dougherty T. J. (1981) Autoradiographic distribution of hematoporphyrin derivative in normal and tumor tissue of the mouse. *Cancer Res.*, 41, 4606-4612.
 34. Camp P. J., Jones A. C., Neely R. K., Speirs N. M. (2002) Aggregation of Copper (II) Tetrasulfonated Phthalocyanine in Aqueous Salt Solutions, *J. Phys. Chem. A*, 106, 10725-10732.
 35. Canti G., Marelli O., Ricci L., Nicolin A. (1981). Hematoporphyrin treated murine lymphocytes: in vitro inhibition of DNA synthesis and light-mediated inactivation of cells responsible for GVHR. *Photochem. Photobiol.*, 34, 589-594.
 36. Capella M.A.M., Capella L.S. (2003) A light in multidrug resistance: Photodynamic treatment of multidrug-resistant tumors. *J. Biomed. Sci.*, 10, 361-366.
 37. Carruth J.A. (1998) Clinical applications of photodynamic therapy. *Int. J. Clin. Pract.*, 52, 39-42.
 38. Castano A. P., Tatiana N. D., Hamblin M. R. (2004) Mechanisms in photodynamic therapy: part-photosensitizers, photochemistry and cellular localisation. *Photodiag. Photodyn. The.*, 1, 279-293.
 39. Cauchon N. (2006) Thérapie photodynamique et détection de l'apoptose. Thèse, University of Sherbrooke, Canada.

40. Cauchon N., Tian H., Langlois R., La Madeleine C., Martin S., Ali H., Hunting D., van Lier J. E. (2005) Structure-Photodynamic Activity Relationships of Substituted Zinc Trisulfophthalocyanines, *Bioconjugate chem.*, 16, 80-89.
41. Cauvin J. F. (1815) Des bienfaits de l'insolation. Ph.D. Thesis, University of Paris, France.
42. Chen Q., Z. Huang, H. Chen, H. Shapiro, J. Beckers and F. W. Hetzel (2002) Improvement of tumor response by manipulation of tumor oxygenation during photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.* 76, 197-203.
43. Chen P., P. D. Zhao, P. Guo, L. Lin, J. W. Liu, Q. Yu (2005) Two-photon excitation of Chlorin-e6-C15 Monomethyl Ester for photodynamic therapy. *Proc. SPIE* 5630, 209-217.
44. Corrêa D. S., Oliveira S. L., Misoguti L., Zilio S. C., Aroca R. F., Constantino C. J. L., Mendonça C. R., (2006) Investigation of the Two-Photon Absorption Cross-Section in Perylene Tetracarboxylic Derivatives: Nonlinear Spectra and Molecular Structure, *J. Phys. Chem. A*, 110, 6433-6438.
45. Cotran R.S., Kumar V., Robbins S.L. (1989) In: *Pathological basis of disease*, Saunders W. B., Philadelphia, PA, pp. 239-305.
46. Cruse-Sawyer J. E. (1996) Tissue and tumour response to photodynamic therapy: photosensitisers and effects on the vascular endothelium, Thèse, The University of Leeds, Leeds, UK.
47. Daniell M. D., Hill J. S. (1991) A History of Photodynamic Therapy, *The Australian and New Zealand journal of surgery*, 61, 340-348
48. Debrus S., Lafait J., May M., Pinçon N., Prot D., Sella C., Venturini J., (2000) Z-scan determination of the third-order optical nonlinearity of gold:silica nanocomposites. *J. Appl. Phys.*, 88, 4469-4475.
49. De Goeij A. F. P. M., Van Straalen R. J. C., Van Steveninck J. (1976) Photodynamic modification of proteins in human red blood cell membranes, induced by protoporphyrin. *Clin. Chim. Acta*, 71, 485-494.
50. De Goeij A. F. P. M., Ververgaet P. H. J. T., Van Steveninck J. (1975) Photodynamic effects of protoporphyrin on the architecture of erythrocyte membranes in protoporphyria and in normal red blood cells. *Clin. Chim. Acta*, 62, 287-92.

51. Dolmans D. E. J. G. J., Fukumura D., Jain R. K., (2003) Photodynamic therapy for cancer. *Nat. Rev. Cancer*, 3, 380-387.
52. De Rosa M. C., Crutchley R. J. (2002) Photosensitized singlet oxygen and its applications. *Coordination Chemistry Reviews*, 233-234, 351-371.
53. Diamond I., Granelli S. G., McDonagh A. F., Nielsen S., Wilson C. B., Jaenicke R. (1972) Photodynamic therapy of malignant tumours. *Lancet*, 2, 1175-1177.
54. Doiron D. R., Keller G. S. (1986) Porphyrin photodynamic therapy: principles and clinical applications. *Curr. Probl. Derm.*, 15, 85-93.
55. Dougherty T. J., Grindey G. B., Fiel R., Weishaupt K. R., Boyle D. G., (1975) Photoradiation therapy. II. Cure of animal tumors with hematoporphyrin and light. *J. Natl. Cancer Inst.*, 55, 115-121.
56. Dougherty T. J., Potter W. R., Weishaupt K. R. (1984) The structure of the active component of haematoporphyrin derivative. *Prog. Clin. Biol. Res.*, 170, 301-14.
57. Dougherty T. J. (1987b), Yearly Review: Photosensitizers: Therapy and detection of malignant tumors, *Photochem. Photobiol.*, 45, 879-889.
58. Dougherty T. J. (1987a) Studies on the structure of porphyrins contained in Photofrin II. *Photochem. Photobiol.*, 46, 569-573.
59. Dougherty T. J. (1974) Activated dyes as anti tumour agents, *Journal of the National Cancer Institute*, 52, 1333-1336.
60. Dougherty T. J., Gomer C. J., Henderson B. W., Jori G., Kessel D., Korbelik M., Moan J., Peng Q. (1998) Photodynamic therapy. *J. Natl. Cancer Inst.* 90, 889-905.
61. Dougherty T. J., Lawrence G., Kaufman J. H., Boyle D., Weishaupt K. R., Goldfarb A. (1979) Photoradiation in the treatment of recurrent breast carcinoma, *J. Natl. Cancer Inst.*, 62, 231-237.
62. Dougherty T. J., Henderson B. W., Schwartz S., Winkelman J. W., Lipson R. L. (1992) Historical perspective. *Photodynamic Therapy*. Marcel Dekker, New York, 1-15.
63. Dougherty, T.J. (1993) - Photodynamic therapy. *Photochem Photobiol*, 58 (6): 895-900.
64. Downes A., Blunt T. P., (1877) Researches on the effect of light upon bacteria and other organisms. *Proc. Roy. Soc. London*, 26, 488-500.
65. Downes A., Blunt T. P. (1878) On the influence of light on protoplasm. *Proc. Royal Soc. London*, 28, 199-212.

66. Downes A., Blunt T. P. (1877) The influence of light upon the development of bacteria. *Nature*, 20, p. 218.
67. Drabkin D. L. (1978) Selected landmarks in the history of porphyrins and their biologically functional derivatives. *The porphyrins*. Academic Press, New York, 31-84.
68. Drobizhev M., Makarov N. S., Stepanenko Y., Rebane A. (2006) *J. Chem. Phys.*, 124, 224701.
69. Drobizhev M., A. Karotki, M. Kruk, N. Zh. Mamardashvili, A. Rebane (2002b) Drastic enhancement of two-photon absorption in porphyrins associated with symmetrical electron accepting substitution. *Chem. Phys. Lett.* 361, 504-512.
70. Drobizhev M., A. Karotki, M. Kruk, A. Rebane (2002a) Resonance enhancement of two photon absorption in porphyrins. *Chem. Phys. Lett.* 355, 175-182.
71. Drobizhev M., A. Karotki, M. Kruk, Y. Dzenis, A. Rebane, F. Meng, C. W. Spangler (2003) Strong two-photon absorption in new porphyrins with asymmetrical meso-substitution. *Proc. SPIE* 5211, 63-74.
72. Drobizhev M., Y. Stepanenko, Y. Dzenis, A. Karotki, A. Rebane, P. N. Taylor, H. L. Anderson (2004) Extremely strong near-IR two-photon absorption in conjugated porphyrin dimers: quantitative description with three-essential-states model. *J. Phys. Chem. B* 109, 7223-7236.
73. Dubbelman T. M. A. R., de Bruijne A. W., Van Steveninck J. (1977) Photodynamic effects of protoporphyrin on red blood cell deformability. *Biochem Biophys. Res. Commun.*, 73, 811-817.
74. Ebbesen P, Pettersen EO, Denekamp J, Littbrand B, Keski-Oja J, Schousboe A, Sonnewald U, Amellem O, Zachar V., Hypoxia, normoxia and hyperoxia-terminology for medical in vitro cell biology, *Acta Oncol.* 2000;39(2):247-8.
75. Epstein J. H. (1990) Phototherapy and photochemotherapy, *The New England journal of medicine.* 322, 1149-1151.
76. Ermolaev V. L., Bodunov E. N., Sveshnikova E. V., Shakhverdov T. A. (1977) Non-radiative Energy Transfer of Electronic Excitation [in Russian], Nauka, Leningrad.
77. Ferraudi G., Argùello G. A., Ali H., van Lier, J. E. (1988) Types I and II sensitized photooxidation of aminoacids by phthalocyanines: a flash photochemical study. *Photochem. Photobiol.*, 47, 657-660

78. Figge F. H. J., Weiland G. S., Manganiello L. O. J. (1948) Cancer detection and therapy. Affinity of neoplastic, embryonic and traumatized regenerating tissues for porphyrins and metalloporphyrins. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 68, 640-641.
79. Figueroa M. P., Santiago J., (2004) Intracellular localization of a long alkyl chain tetraphenylporphyrin and chloride channel activation in *Psammobatis extenta* electrocytes. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 3, 33-35.
80. Finsen, N. R., In *Phototherapy*, 1901, London, Edward Arnold
81. Fischer A., Cremer C., Stelzer E. H., (1995) Fluorescence of coumarins and ... with a pulsed titanium-sapphire laser, *Appl. Opt.*, 34, 1989-2003.
82. Fitzpatrick T. B., Pathak M. A. (1959) Historical aspects of methoxsalen and other furanocoumarins. *J. Invest. Derm.*, 32, 229-231.
83. Fluhler E. N., Hurley J. K., Kochevar I. E. (1989) Laser intensity and wavelength dependence of Rose-Bengal-photosensitized inhibition of red blood cell acetylcholinesterase. *Biochim. Biophys. Acta*, 990, 269-275.
84. Foote C. S., Clennan E. L. (1995) Foote C. S., Valentine J. S., Greenberg A. and Liebman J. F. (ed.) In: *Active oxygen in chemistry*, Chapman and Hall, London, 2, pp. 105.
85. Foote C. S., (1991) Definition of type I and type II photosensitized oxidation. *Photochem. Photobiol.*, 54, 659-664.
86. Foote C. S., (1968) Photosensitized Oxygenations and the Role of Singlet Oxygen. *Acc. Chem. Res.*, 1, 104-110.
87. Foote, C. S., and Wexler, S. (1964a) Olefin Oxidations with Excited Singlet Molecular Oxygen, *J. Amer. Chem. Soc.*, 86, 3879-3880.
88. Foote, C. S., and Wexler, S. (1964b) A Probable Intermediate in Photosensitized Autoxidations, *J. Amer. Chem. Soc.*, 86, 3880-3881.
89. Fournier M., Pépin C., Houde D., Ouellet R., van Lier J. E., (2003) Ultrafast studies of the excited-state dynamics of copper and nickel phthalocyanine tetrasulfonates : Potentiel sensitizers for the two-photon photodynamic therapy of tumours. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2, 1-8.
90. Fraunhofer, J. (1814-1815) *Denkschriften der Munch. Akad. Wiss.*, 5, 193-226.

91. Freeman T. L., Cope S. E., Stringer M. R., Cruse-Sawyer J. E., Brown S. B., Batchelder D. N., Birbeck K., (1998) Investigation of the subcellular localization of zinc phthalocyanines by raman mapping. *Appl. Spectrosc.*, 52, 1257-1263.
92. Fuchs J., Thiele J. (1998) The role of oxygen in cutaneous photodynamic therapy. *Free Radic. Biol. Med.*, 24, 835-847.
93. Fuh Y.-G. A., Lin H.-C., Mo T.-S., Chen C.-H. (2005) Nonlinear optical property of azo-dye doped liquid crystals determined by biphotonic Z-scan technique. *Opt. Express*, 13, 10634-10641.
94. Gantchev T. G., van Lier J. E. (1995) Catalase inactivation following photosensitization with tetrasulfonated metallophthalocyanines. *Photochem. Photobiol.*, 62, 123-134.
95. Gad F., Viau G., Boushira M., Bertrand R., Bissonnette R., (2001) Photodynamic Therapy with 5-Aminolevulinic Acid Induces Apoptosis and Caspase Activation in Malignant T Cells. *J. Cutan. Med. Surg.*, 5, 8-13.
96. Gilson M. K., Straatsma T. P., McCammon J. A., Ripoll D. R., Faerman C. H., Axelsen P. H., Silman I., Sussman J. L. (1994) Open back door in a molecular dynamics simulation of acetylcholinesterase, *Science*, 263, 1276-1278.
97. Girotti A. W. (1976) Photodynamic action of protoporphyrin IX on human erythrocytes: cross-linking of membrane proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 72, 1367-1374.
98. Gomer C. J., Dougherty T. J. (1979) Determination of {³H}- and {¹⁴C} hematoporphyrin derivative distribution in malignant and normal tissue. *Cancer Res.*, 39, 146-151.
99. Gómez S. L., Cuppo F. L. S., Figueiredo Neto A.M., (2003) Nonlinear optical properties of liquid crystals probed by Z-scan technique. *Brazilian J. Phys.*, 33, 813-819.
100. Gouterman M., Mathies R. A., Smith B. E. (1970) Porphyrins XIX. Triplet and Quartet Luminescence in Cu and VO complexes. *J. Chem. Phys.*, 52, 3795-3802.
101. Goyan, R. L., Cramb D. T. (2000) Near-infrared two-photon excitation of protoporphyrin IX: photodynamics and photoproduct generation. *Photochem. Photobiol.* 72, 821-827.
102. Grossweiner D. I. (2005) The Science of Phototherapy. Jones L. R. (ed.) In: An Introduction, Springer, Chicago, IL, USA
103. Halbhuber K. J., Lemke C., Stibenz D., Linss W. (1984) Activation of acetylcholine esterase (ACHE) as a sign of erythrocyte membrane alteration. *Exp. Pathol.*, 25, 35-44.

104. Hausmann W. (1908). Die sensibilisierende Wirkung tierscher Farbstoffe und ihre physiologische Bedeutung. *Wien. Klin. Wochnschr.*, 21, 1527-1529.
105. Hayata Y., Konaka C. (1990) Photodynamic therapy of neoplastic disease, In: David Kessel (ed) *Photodynamic Therapy of Neoplastic disease*, CRC Press, Boca Raton, Florida, 1, 44-63.
106. Henderson B. W., Fingar V. (1987) Relationship of tumor hypoxia and response to photodynamic treatment in an experimental mouse tumor. *Cancer Res.*, 47, 3110-3114.
107. Henderson B. W., Waldow S. M., Mang T. S., Potter W. R., Malone P. B., Dougherty T. J. (1985). Tumor destruction and kinetics of tumor cell death in two experimental mouse tumors following photodynamic therapy. *Cancer Res.*, 45, 572-576.
108. Henderson B. W., Dougherty T. J. (1992) How does photodynamic therapy work? *Photochem Photobiol.*, 55, 145-57.
109. Hermann, J. P., Ducuing J., (1972) Absolute measurement of two-photon cross sections. *Phys. Rev. A*, 5, 2557-2568.
110. Hilf R. (2007) Mitochondria are targets of photodynamic therapy. *J. Bioenerg. Biomembr.* 39, 85-89.
111. Hill R. P. (1987) Cellular basis of radiotherapy. tannock I. F. and Hill R. P. (ed.) In *The basic Science of Oncology*, Pergamon, New York, pp. 237-255.
112. Honig C. R. (1981) *Modern cardiovascular physiology*, Littlebrown, Boston, MA, pp. 185-187.
113. Hoppe-Seyler F. (1871) *Med. Chem. Untersuchungen*. Eberhard-Karls-Universitat, Berlin, pp. 124-528.
114. Howe L., Zhang J. Z. (1998) The Effect of Biological Substrates on the Ultrafast Excited-State Dynamics of Zinc Phthalocyanine Tetrasulfonate in Solution. *Photochem. Photobiol.*, 67, 90-96
115. Howe L., Zhang J. Z. (1997) Ultrafast Studies of Excited-State Dynamics of Phthalocyanine and Zinc Phthalocyanine Tetrasulfonate in Solution. *J. Phys. Chem. A: Chem.*, 101, 3207-3213.
116. Y. Huang, G. Xu, Y. Peng, H. Lin, X. Zheng and M. Xie, (2007) Zinc phthalocyanine tetrasulfonate (ZnPcS4): a new photosensitizer for photodynamic therapy in choroidal neovascularization. *J. Ocul. Pharmacol. Therapeut.*, 23, 377-86

117. Jackson A. H. (1978) Phthalocyanines. Dolphin D., (Ed.) In *The Porphyrins*, Academic Press, New York, 1, 374.
118. Jacques S. L., Bargo P., Goodell T., Steven R., Kovall G., Blair G. (2002) Variability of tissue optical properties in cancer patients receiving photodynamic therapy, *Proceedings of the second joint EMBS/BMES conference*, 3, 2283- 2284.
119. Kallinowski F., Schienger K. H., Runkel S., Kloes M., Stohrer M., Okunieff P., Vaupel P. (1989) Blood flow, metabolism, cellular microenvironment, and growth rate of human tumor xenografts. *Cancer Res.*, 49, 3759-3764.
120. Kaneko Y., Nishimura Y., Arai T., Sakuragi H., tokumaru K., Matsunaga D., (1995) UV light and red light chemistry of metallophthalocyanine: Wavelength dependent photochemical reduction of tetrasodium salts of Zn(II) and Cu (II) tetrasulphonatophthalocyanines with amines, *J. Photochem. Photobiol., A, Chem.*, 89, 37-44.
121. Karotki A., Drobizhev M., Kruk M., Spangler C., Nickel E., Mamardashvili N., Rebane A. (2003) Enhancement of two-photon absorption in tetrapyrrolic compounds. *Opt. Soc. Am. J. B.*, 20, 321-332.
122. Karotki A., Khurana M., Lepock J. R., Wilson B. C. (2006) Simultaneous Two-Photon Excitation of Photofrin® in Relation to Photodynamic Therapy. *Photochem. Photobiol.*, 82, 443-452.
123. Kasha M. (1985) in *Singlet O₂*, Frimer A. A. (ed.) CRC Press, Boca Raton, Florida, 1, pp. 1-11.
124. Kautsky H., de Bruin H. (1931) Die Aufklärung der Photolumineszenztilgung fluoreszierender Systeme durch Sauerstoff: Die Bildung aktiver, diffusionsfähiger Sauerstoffmoleküle durch Sensibilisierung, *Naturwiss.*, 19, 1043.
125. Kaye A. H., Morstyn G., Ashcroft R. G. (1985) Uptake and retention of hematoporphyrin derivative in an in vivo/in vitro model of cerebral glioma. *Neurosurgery*, 17, 883-890.
126. Kelly J. F., Snell M. E., Berenbaum M. C. (1975) Photodynamic destruction of human bladder carcinoma. *Br. J. Cancer*, 31, 237-244.

127. Kessel D., Thompson P., Saatio K., Nantwi K. D. (1987). Tumor localization and photosensitization by sulfonated derivatives of tetraphenylporphine. *Photochem. Photobiol.*, 45, 787-790.
128. Kessel D., Luo Y. (1998) Mitochondrial photodamage and PDT-induced apoptosis. *J. Photochem. Photobiol., B: Biol.*, 42, 89-95.
129. Kessel D. (1986a) Sites of photosensitization by derivatives of hematoporphyrin. *Photochem. Photobiol.*, 44, 489-493.
130. Kessel D. (1986b) Porphyrin-lipoprotein association as a factor in porphyrin localization. *Cancer Lett.*, 3, 183-188.
131. Khan S. A., Dougherty T. J., Mang T. S., (1993) An evaluation of photodynamic therapy in the management of cutaneous metastases of breast cancer. *Eur. J. cancer*, 29A, 1686-1690.
132. Khurana M., Collins H. A., Karotki A., Anderson H. L., Cramb D. T., Wilson B. C. (2007) Quantitative in vitro demonstration of two-photon photodynamic therapy using Photofrin and Visudyne. *Photochem. Photobiol.*, 83, 1441-1448.
133. Kim O.-K., Lee K.-S., Woo H. Y., Kim K.-S., He G. S. (2000) J. Swiatkiewicz and P. N. Prasad, *Chem. Mater.*, 12, 284.
134. Kirchhoff G. R. (1862) *Untersuchungen uber das Sonenspektrum und die Spektern der chemischen Elemente*, Dummler, Berlin.
135. Korbelik M. (1996) Induction of tumor immunity by photodynamic therapy. *J. Clin. Laser Med. Surg.*, 14, 329-334.
136. Kotler Z., Segal J., Sigalov M., Ben-Asuly A., V. Khodorkovsky (2000) Two photon absorption properties of bis(n-carbazolyl)-poly-phenylenes, *Synthetic Metals*, 115, 269-273.
137. Krasnovsky A.A. (1998) Singlet molecular oxygen in photobiochemical systems: IR luminescence studies. *Membrane Cell Biol.*, 12, 665-690.
138. Krasnovsky A. A. Jr. (2007) Primary Mechanisms of Photoactivation of Molecular Oxygen. *History of Development and the Modern Status of Research, Biochemistry (Moscow)*, 72, 1065-1080.

139. Krasnovsky A. A. Jr. (1990) in *Advances in Science and Technology. Modern Problems of Laser Physics*. Akhmanov S. A. and Chernyaeva V. B. (ed.) [in Russian], VINITI, Moscow, 3, pp. 63-135.
140. Kreitner M., Ebermann R., Alth G. (1996) Quantitative determination of singlet oxygen. Production by porphyrins, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, 36, 109-111.
141. Kruk M., A. Karotki, M. Drobizhev, A. Rebane, G. Isakov, P. Petrov (2003) Two-photon excitation in photodynamic therapy. *Proceedings of the International Conference Laser Physics and Applications*. (Edited by N. S. Kazak, V. A. Savva, A. P. Nizovtsev, G. R. Mostovnikova), Minsk, pp.263-265.
142. Kuznetsova N. A., Makarov D. A., Kaliya O. L., Vorozhtsov G. N. (2007) Photosensitized oxidation by dioxygen as the base for drinking water disinfection, *J. Hazard. Mater.*, 146, 487-491.
143. Kyoung M., Lee M., (2000) Z-scan study of the third-order optical nonlinearity of Au nanoparticles embedded in TiO₂, *Bull. Korean Chem. Soc.*, 21, 26-28.
144. Lambert C., Sarna T., Truscott T. G. (1990) Rose Bengal radicals and their reactivity. *J. Chem. Soc., Faraday Trans.*, 86, 3879-3882.
145. Lamber C. R., Stiel H., Leupold D., Lynch M. C., Kochevar I. E. (1996) Intensity-Dependent Enzyme Photosensitization Using 532 nm Nanosecond Laser Pulses. *Photochem. Photobiol.*, 63, 154-160.
146. Lambert C. R., Kochevar I. E., Redmond R. W. (1999) Differential Reactivity of Upper Triplet States Produces Wavelength-Dependent Two-Photon Photosensitization Using Rose Bengal, *J. Phys. Chem. B*, 103, 3737-3741
147. Langlois R., Ali H., Brasseur N., Wagner J. R., van Lier J. E., Biological activities of phthalocyanines-IV. Type II sensitized photooxidation of L-Tryptophan and cholesterol by sulfonated metallo phthalocyanines. *Photochem. Photobiol.*, 1986, 44, 117-123.
148. Laustriat G. (1986) Molecular mechanisms of photosensitization. *Biochimie*, 68, 771-778.
149. Lee See, K., I. J. Forbes and W. H. Betts (1984) Oxygen dependency of photocytotoxicity with haematoporphyrin derivative. *Photochem. Photobiol.* 39, 631-634.

150. Leupold D., Freyer W. (1992) Proposal of modified mechanism for photodynamic therapy. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, 12, 311-313.
151. Lewis J. S., Lee J. A., Underwood J. C., Harris A. L., Lewis C. E. (1999) Macrophage responses to hypoxia: relevance to disease mechanisms. *Journal of Leukocyte Biology*, 66, 889-900.
152. Li S. -L., Wu J. -Y., Tian Y. -P., Tang Y. -W., Jiang M. -H., Fun H. K., Chantrapromma S., (2006) Preparation, characterization, two-photon absorption and optical limiting properties of a novel metal complex containing carbazole. *Opt. Mater.*, 28, 897-903.
153. Licha K., Olbrich C., (2005) Optical imaging in drug discovery and diagnostic applications, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57, 1087-1108.
154. Lindig B. A., Rodgers M. A. J., Schaap A. P. (1980) Determination of the lifetime of singlet oxygen in water-d₂ using 9,10-anthracenedipropionic acid, a water-soluble probe. *J. Am. Chem. Soc.* 102, 5590-5593.
155. Lipson R. L., Baldes E. J., Gray M. J. (1967) Hematoporphyrin derivative for detection and management of cancer. *Cancer*, 20, 255-257.
156. Liu J., Y. W. Zhao, J. Q. Zhao, A. D. Xia, L. J. Jiang, S. Wu, L. Ma, Y. Q. Dong, Y. H. Gu (2002) Two-photon excitation studies of hypocrellins for photodynamic therapy. *J. Photochem. Photobiol. B* 68, 156-164.
157. Lustigman S., Ben-Hur E. (1996) Photosensitized inactivation of plasmodium falciparum in human red cells by phthalocyanines. *Transfusion*, 36, 543-546.
158. Maillard P., Krausz P., Giannotti C. (1980) Photoinduced activation of molecular oxygen by various porphyrins, bis-porphyrins, phthalocyanines, pyridinoporphyrazins, and their metal derivatives. *J. Organomet. Chem.*, 197, 285-290.
159. Marcano O. A., Maillotte H., Gindre D., Métin D., Picosecond nonlinear refraction measurement in single-beam open Z scan by charge-coupled device image processing. *Opt. Lett.*, 1996, 21, 101-103.
160. Marengo S., Houde D., Brasseur N., Nguyen T. L., Ouellet R., van Lier J. E. (1994) Measure of the singlet oxygen yield generated from naphthalocyanine photosensitizers. *J. Chim. Phys.*, 91, 1211-1219.

161. Margolis-Nunno H., Ben-Hur E., Gottlieb P., Robinson R., Oetjen J., Horowitz B. (1996) Inactivation by phthalocyanine photosensitization of multiple forms of human immunodeficiency virus in red cell concentrates. *Transfusion*, 36, 743-750.
162. Martinez G. R., Garcia F., Catalani L. H., Cadet J., Oliveira M. C. B., Ronsein G. E., Miyamoto S., Medeiros M. H. G., Di Mascio P. (2006) Synthesis of a hydrophilic and non-ionic anthracene derivative, the N,N'-di-(2,3-dihydroxypropyl)-9,10-anthracenedipropanamide as a chemical trap for singlet molecular oxygen detection in biological systems. *Tetrahedron*, 62, 10762-10770.
163. Mathai S., Bird D. K., Stylli S. S., Smith T. A., Ghiggino K. P. (2007) Two-photon absorption cross-sections and time-resolved fluorescence imaging. using porphyrin photosensitisers. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 6, 1019.
164. McCall D. B. (1984) Ph.D. Thesis, Wayne State University.
165. McVie J., Sinclair R. S. et Truscott T. G. (1978), Triplet States of Copper and Metal-Free Phthalocyanines, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, 2, 1870-1879
166. Meshalkin Y. P., Chunosova S. S., (2005) Two-photon absorption cross section of aluminium phthalocyanine excited by a femtosecond Ti:sapphire laser. *Quantum electronics*, 35, 527-530.
167. Meshalkin Y. P., E. E. Alfimov, N. E. Vasil'ev, A. N. Denisov, V. K. Makukha, A. P. Ogirenko (1999) Two-photon excitation of aluminium phthalocyanines. *Quant. Electron.* 29, 1066-1068.
168. Meyer-Betz F. (1913) Untersuchungen uber die biolgische (photodynamische) Wirkung des hamatoporphyrins und andere Derivate des Blut- und Gallenfarbstoffs Deutsch. *Arch. Klin. Med.*, 112, 476-503.
169. Minaev B. F., Tikhomirov V. A. (1984) Mechanism of the reaction of molecular oxygen with ethylene by the MINDO/3 method [in Russian], *Zh. Fiz. Khim.*, 58, 646-652.
170. Mitchell, J. B., S. McPherson, W. DeGraff, J. Gamson, A. Zabell and A. Russo (1985) Oxygen dependence of hematoporphyrin derivative-induced photoinactivation of Chinese hamster cells. *Cancer Res.* 45, 2008-2011.
171. Moan J., Berg K. (1991) The photodegradation of porphyrins in cell can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen. *Photochem. Photobiol.*, 53, 549-553.

172. Moan J. (1986), Porphyrin photosensitization and phototherapy. *Photochem. Photobiol.*, 43, 681-690.
173. Moan J., Berg K. (1992), Photochemotherapy of cancer : Experimental research. *Photochem. Photobiol.*, 55, 931-948.
174. Moan J., Berg K., Anholt H., Madslien K. (1994) Sulfonated aluminium phthalocyanines as sensitizers for photochemotherapy. Effects of small light doses on localization, dye fluorescence and photosensitivity in V-79 cells. *Int. J. Cancer*, 58, 865-870.
175. Moan J., Peng Q. (2003) An outline of the hundred-year history of PDT. *Anticancer Res.*, 23, 3591-3600
176. Moan J., Sommer S. (1985) Oxygen dependence of the photosensitizing effect of hematoporphyrin derivative in NHIK 3025 cells. *Cancer Res.*, 45, 1608-1610.
177. Moan J, Berg K, Kvam E et al. (1989) Intracellular localization of photosensitizers. Harnett S. (ed.) In *Photosensitizing compounds: their chemistry, biology and clinical use*. Chichester, UK, Wiley, 95-107.
178. Moan J., Petterson E. O., Christensen T. (1979) The mechanism of photodynamic inactivation of human cells in vitro in the presence of haematoporphyrin. *Br. J. Cancer*, 39, 398-407.
179. Moan J., Berg K., Steen H. B., Warloe T., Madslien K. (1992) Fluorescence and photodynamic effects of phthalocyanines and porphyrins in cells. Henderson B. W., Dougherty T. J. (ed.) In *Photodynamic therapy*, Marcel Dekker Inc., New York, Basel, Hong Kong, pp. 19-35.
180. Moore G. E., Gerner R. E., Franklin H. A., (1967) Culture of Normal Human Leukocytes. *The J. Am. Med. Assoc.*, 199, 519-524.
181. Moser J. G. (1997) Definitions and general properties of 2nd and 3rd generation photosensitizers. Moser J. G. (ed.) In *Photodynamic Tumor Therapy 2nd and 3rd Generation Photosensitizers*. Harwood Academic Publishers, London. pp. 3-8.
182. Mosmann T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, 65, 55-63.
183. Moureu C., Dufraisse C., Dean P. M. (1926) *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences (Paris)*. 182, 1584-1586.

184. Muller P. J., Wilson B. C., (2006) Photodynamic therapy of brain tumors--a work in progress. *Lasers Surg. Med.*, 38, 384-389.
185. Mulliken, R. S. (1928a) Interpretation of the Atmospheric Oxygen Bands; Electronic Levels of the Oxygen Molecule, *Nature*, 122, 505-505.
186. Mulliken R. S. (1928b) Interpretation of the Atmospheric Absorption Bands of Oxygen. *Phys. Rev.*, 32, 880-887.
187. Negres R. A., Hales J. M., Kobayakov A., Hagan D. J., van Stryland E. W. (2002) Two-Photon spectroscopy and analysis using a white-light continuum probe. *Opt. Lett.*, 27, 270-272.
188. Niedre M., Patterson M. S., Wilson B. C. (2002) Direct near-infrared luminescence detection of singlet oxygen generated by photodynamic therapy in cells in vitro and tissues in vivo. *Photochem. Photobiol.*, 75, 382-391.
189. Niedre M. J., Yu C. S., Patterson M. S., Wilson B. C. (2005) Singlet oxygen luminescence as an in vivo photodynamic therapy dose metric: validation in normal mouse skin with topical amino-levulinic acid. *Br. J. Cancer*, 92, 298-304.
190. Niedre M. J., Secord A. J., Patterson M. S., Wilson B. C. (2003) In Vitro Tests of the Validity of Singlet Oxygen Luminescence Measurements as a Dose Metric in Photodynamic Therapy, *Cancer Res.*, 63, 7986-7994.
191. Nikolaitchik A. V., Rodgers M. A. J. (1999) Crown ether substituted monomeric and cofacial dimeric metallophthalocyanines. 2. Photophysical studies of the cobalt(II) and nickel(II) variants, *J. Phys. Chem.*, 103, 7597-7605.
192. Nolte H. J., Rosenberry T. L., Neumann E. (1980) Effective charge on acetylcholinesterase active sites determined from the ionic strength dependence of association rate constants with cationic ligands. *Biochem.*, 19, 3705-3711.
193. Nowis D., Makowski M., Stokłosa T., Legat M., Issat T., Gołab J., (2005) Direct tumor damage mechanisms of photodynamic therapy, *Acta Biochim. Pol.*, 52, 339-352.
194. Nowis D., Stokłosa T., Legat M., Issat T., Jakóbsiak M., Gołab J., (2005a) The influence of photodynamic therapy on the immune response, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2, 283-298.
195. Ochsner M. (1997) Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, 39, 1-18.

196. O'Connor D.V., Philips D. (1984) Time-correlated single photon counting, Academic Press, London.
197. Oh D. H., R. J. Stanley, M. Lin, W. K. Hoeffler, S. G. Boxer, M. W. Berns, E. A. Bauer (1997) Two-photon excitation of 4'-hydroxymethyl-4,5',8-trimethylpsoralen. *Photochem. Photobiol.* 65, 91-95.
198. Oleinick N.L., Evans H.H. (1998) The photobiology of photodynamic therapy: cellular targets and mechanisms. *Radiat Res.*, 150 (5 Suppl), S146-56.
199. Oliveira S. L., Corrêa D. S., De Boni L., Misoguti L., Zilio S. C., Mendonça C. R. (2006) Two-photon absorption cross-section spectrum of MEH-PPV obtained using the white-light continuum Z-scan technique, *Appl. Phys. Lett.*, 88, 021911-021913.
200. Oulianov D., Tomov I., Dvornikov A., Rentzepis P., (2001) Observations on the measurement of two-photon absorption cross-section, *Opt. Commun.*, 191, 235-243.
201. Policard A. (1924) Études sur les aspects offerts par des tumeurs expérimentales examinées à la lumière de Wood. *Comptes Rendus Soc. Biol.*, 91, 1423-1428.
202. Pass H. I. (1991) Photodynamic therapy for lung cancer. *Chest Surg. Clin. North Am.*, 1, 135-51.
203. Patterson M. S., Madsen S. J., Wilson B. C. (1990) Experimental tests of the feasibility of singlet oxygen luminescence monitoring in vivo during photodynamic therapy. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 5, pp. 69-84.
204. Paul A., Mölich A., Oelckers S., Seifert M., Röder B. (2002) Alkyl-substituted magnesium phthalocyanine: phototoxicity after excitation of higher electronic states in cells in vitro. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, 6, 340-346.
205. Pelliccioli A. P., Henbest K., Kwag G., Carvagno T. R., Kenney M. E., Rodgers M. A. J. (2001) Synthesis and Excited State Dynamics of μ -Oxo Group IV Metal Phthalocyanine Dimers : A Laser Photoexcitation Study, *J. Phys. Chem. A*, 105, 1757-1766.
206. Raab O. (1900) Ueber die Wirkung Fluorescierenden Stoffe auf Infusorien. *Z. Biol.*, 39, 524-546.
207. Radic Z., Kirchhoff P.D., Quinn D.M., McCammon J.A., Taylor P. (1997) Electrostatic influence on the kinetics of ligand binding to acetylcholinesterase. Distinctions between active center ligands and fasciculin. *J. Biol. Chem.*, 272, 23265-23277.

208. Rassmussen-Taxdal D. S., Ward G. E., Figge F. H. J. (1955) Fluorescence of human lymphatic and cancer tissues following high doses of intravenous hematoporphyrin. *Cancer*, 8, 78-81.
209. Redmond R. W., Scaiano J. C., Johnston L. J. (1992) Substituent Effects on the Photochemistry of Diphenyl Ketyl Radicals: Elucidation of the Rate Constants and Quantum Yields of Relaxation Processes from the Excited Radicals. *J. Am. Chem. Soc.*, 114, 9768-9773.
210. Ripoll D. R., Faerman C. H., Axelsen P. H., Silman I., Sussman J. L. (1993) An electrostatic mechanism for substrate guidance down the aromatic gorge of acetylcholinesterase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 90, 5128-5132.
211. Rosenthal I., Krishna C. M., Riesz P., Ben-Hur E. (1986) The Role of Molecular Oxygen in the Photodynamic Effect of Phthalocyanines. *Radiat. Res.*, 107, 136-142.
212. Rückmann I., Zeug A., Herter R., Röder B. (1997) On the Influence of Higher Excited States on the ISC Quantum Yield of Octa- α -alkyloxy-substituted Zn-Phthalocyanine Molecules Studied by Non Linear Absorption. *Photochem. Photobiol.*, 66, 576-584.
213. Rysanyansky A., Palpant B., Debrus S., Ganeev R., Stepanov A., Can N., Buchal C., Uysal S., (2005) Nonlinear optical absorption of ZnO doped with copper nanoparticles in the picosecond and nanosecond pulse laser field. *Appl. Opt.*, 44, 2839-2845.
214. Sadowska M., Krajewska E., Bryszewska M. (2001) Photodynamically Induced Changes of Acetylcholinesterase Activity From Human Erythrocytes, *Lasers Med. Sci.*, 16, 10-15.
215. Salokhiddinov K. I., Buteva I. M., Dzhagarov B. M. (1979) Duration of the luminescence of singlet oxygen in solution following pulsed laser excitation. *Opt. Spectrosc.*, USSR, 47, 487-490.
216. Samkoe K. S., Clancy A. A., Karotki A., Wilson B. C., Cramb D. T. (2007) Complete blood vessel occlusion in the chick chorioallantoic membrane using two-photon excitation photodynamic therapy: implications for treatment of wet age-related macular degeneration. *J. Biomed. Opt.*, 12, 34025-34038.
217. Scaiano J. C., Johnston L. J., McGimpsey W. G., Weir D. (1988) Photochemistry of organic reaction intermediates: novel reaction paths induced by two-photon laser excitation, *Acc. Chem. Res.*, 21, 22-29.

218. Schaffer A. M., Gouterman M., Davidson E. R. (1973) Porphyrins XXVIII. Extended Hückel Calculations on Metal Phthalocyanines and Tetrazaporphyrins, *Theoret. Chim. Acta (Berl.)*, 30, 9-30.
219. Schneider U, Schwenk H, Bornkamm G (1977) Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma, *Int. J. Cancer*, 19, 621-626.
220. Schutte W. J., Sluyters-Rehbach M., Sluyters J. H. (1993) Aggregation of an octasubstituted phthalocyanine in dodecane solution. *J. Phys. Chem.*, 97, 6069-6073.
221. Schweitzer C., Schmidt R. (2003) Physical mechanisms of generation and deactivation of singlet oxygen. *Chem. Rev.* 103, 1685-1757.
222. Schwartz S. K., Absolon K., Vermund H. (1955) Some relationships of porphyrins, x-rays and tumors. *Univ. Minn. Med. Bull.* 27, 7-13.
223. Sengupta P., Balaji J., Banerjee S., Philip R., Ravindra Kumar G., Maiti S. (2000) Sensitive measurement of absolute two-photon absorption cross sections, *J. Chem. Phys.* 112, 9201-9205.
224. Sharman W. M., Allen C. M., van Lier J. E. (2000) Role of activated oxygen species in photodynamic therapy. *Methods Enzymol.*, 319, 376-400.
225. Sharman W. M., Allen C. M., van Lier J. E. (1999) Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications. *Drug Discov Today*, 4, 507-517.
226. Sheik-Bahae M., Said A. A., Wei T., Hagan D., van Stryland E. W. (1990) Sensitive measurement of optical nonlinearities using a single beam. *IEEE J. Quantum Electron*, 26, 760-769.
227. Shettigar S., Chandrasekharan K., Umesh G., Sarojini B. K., Narayana B. (2006) Studies on nonlinear optical parameters of bis-chalcone derivatives doped polymer. *Polymer*, 47, 3565-3567.
228. Shyam K., Penketh P. G., Shapiro M., Belcourt M. F., Loomis R. H., Rockwell S., Sartorelli A. C., (1999) Hypoxia-selective nitrobenzyloxycarbonyl derivatives of 1,2-bis(methylsulfonyl)-1-(2-chloroethyl)hydrazines, *J. Med. Chem.*, 42, 941-946.

229. Silva D. L., Guedes I., Zilio S. C., Misoguti L., Mendonça C. R. (2005) Femtosecond pulse compression using the Z-scan technique and closed-loop evolutionary algorithm. *J. Appl. Phys.*, 98, 083521-083524.
230. Smith G., McGimpsey W. G., Lynch M., Kochevar I. E. and Redmond R. W., An efficient oxygen independent two-Photon photosensitization mechanism, *Photochem. Photobiol.*, 1994, 59, 135–139.
231. Smith G. J. (1985) The effects of aggregation on the fluorescence and the triplet state yield of hematoporphyrin. *Photochem. Photobiol.*, 41, 123-126.
232. Spangler C. W., Starkey J. R., Rebane A., Meng F., Gong A., Drobizhev M. (2006) Synthesis, characterization, and preclinical studies of two-photon-activated targeted PDT therapeutic triads. In *Proc. SPIE*, SPIE, Bellingham, WA, 6139, 219-228.
233. Spangler C. W., F. Meng, A. Gong, M. A. Drobizhev, A. Karotki, A. Rebane (2004) Nanophotonic ensembles for targeted multi-photon photodynamic therapy. *Proc. SPIE* 5331, 84-91.
234. Spikes J. D. (1985) The historical development of ideas on applications of photosensitized reactions in health sciences. In *Primary Photoprocesses in Biology and Medicine*. Bergasson R. V., Jori G., Land E. J. and Truscott T. G. (ed.) Plenum Press, New York, pp. 209-227.
235. Spikes J. D., Straight R., (1967) Sensitized photochemical process in biological systems, *Annu. Rev. Phys. Chem.*, 18, 409-436.
236. Spikes J. D. (1975) Porphyrins and related compounds as photodynamic sensitizers. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 244, 496-508.
237. Stables G. I., Ash D. V. (1995) Antitumour treatment: Photodynamic therapy. *Cancer Treat. Rev.*, 21, 311-23.
238. Steinbeck J., Khan A. U., Karnovsky M. J., (1992) Intracellular singlet oxygen generation by phagocytosing neutrophils in response to particles coated with a chemical trap. *J. Biol. Chem.*, 267, 13425-13433.
239. Stiel H., Teuchner K., Paul A., freyer W., Leupold D., (1994) Two-photon excitation of alkaly-substituted magnesium phthalocyanine: Radical formation via higher excited states, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, 80, 289-298.

240. Sussman J. L., Harel M., Frolov F., Oefner C., Goldman A., Tokar L., Silman I. (1991) Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: a prototypic acetylcholine-binding protein. *Science*, 253, 872-879.
241. Sussman J. L., Harel M., Silman I. (1992) In *Multidisciplinary Approaches to Cholinesterase Function*. Shaffermann A. Velan B. (ed.) Plenum Press, New York, pp. 95-108.
242. Tan R. C., Truong T. N., McCammon J. A., Sussman J. L. (1993) Acetylcholinesterase: electrostatic steering increases the rate of ligand binding. *Biochem.*, 32, 401-403.
243. Tannock I. F. (1987) Experimental chemotherapy. In Tannock I. F. and Hill R. P. (ed.) *The Basic Science of Oncology*, Pergamon, New York, pp. 308-325.
244. Terenin A. N. (1967) *Photonics of Dye Molecules* [in Russian], Nauka, Leningrad.
245. Thomson S. H., Emmet E. A., Fox S. H. (1974) Photodestruction of mouse epithelial tumours after oral acridine orange and argon laser, *cancer Res.*, 34, 3124-3127.
246. Tomlinson G, Mutus B, McLennan I (1981) Activation and inactivation of acetylcholinesterase by metal ions. *Can. J. Biochem.*, 59, 728-735.
247. Tōugu V. (2001) Acetylcholinesterase: mechanism of catalysis and Inhibition. *Curr. Med. Chem.*, 1, 155-170.
248. Turro N. J., (1991) *Modern Molecular Photochemistry*, Paperback (ed.) University Science Books, Sausalito, pp. 103-117.
249. Twarowski A. J., Kliger D. S. (1977) Multiphoton absorption spectra using thermal blooming. *Chem. Phys.*, 20, 259-264.
250. Valenzano D. P., (1987) Photomodification of biological membranes with emphasis on singlet oxygen mechanisms, *Photochem. Photobiol.*, 46, 147-160.
251. Valenzano D. P., Pooler J. P. (1982) Cell membrane photomodification: relative effectiveness of halogenated fluoresceins for photohemolysis. *Photochem. Photobiol.*, 35, 343-350.
252. van den Bergh H. (2001) Photodynamic therapy of age-related macular degeneration: History and principles, *Seminars in ophthalmology*. 16, 181-200.
253. van Lier J. E. (1990a) Prospects of phthalocyanines as a photosensitizers for the photodynamic therapy of cancer. In: Gomer C. J. (ed.) *Future direction and application in photodynamic therapy*, SPIE optical engineering press, pp. 107-114.

254. van Lier J. E. (1990) Phthalocyanines as sensitizers for PDT of cancer. In: Kessel D. (ed.) Photodynamic Therapy of Neoplastic disease. CRC Press, Boca Raton, Florida, 1, pp. 279-290.
255. Vaupel P., Fortmeyer H. P., Runkel S., Kallinowski F. (1987) Blood Flow, Oxygen Consumption, and Tissue Oxygenation of Human Breast Cancer Xenografts in Nude Rats. *Cancer Res.*, 47, 3496-3503.
256. Vaupel P. W., Frinak S., Bicher H. I. (1981) Heterogeneous oxygen partial pressure and pH distribution in C3H mouse mammary adenocarcinoma. *Cancer Res.*, 41, 2008-2013.
257. Vaupel P. (1977) Hypoxia in neoplastic tissue. *Microvasc. Res.*, 13, 399-408.
258. Vaupel P. (1979) Oxygen supply to malignant tumors. In: Peterson H-I (ed.) Tumor blood circulation: angiogenesis, vascular morphology, and blood flow of experimental and human tumors. CRC Press Inc., Boca Raton, FL, pp 143-168.
259. Vaupel P., Mayer A. (2005) Hypoxia and anemia : effects on tumor biology and treatment resistance. *Transfus. Clin. Biol.*, 12, 5-10.
260. Vaupel P., Kallinowski F., Okunieff P., (1989) Blood Flow, Oxygen and Nutrient Supply, and Metabolic Microenvironment of Human Tumors. *Cancer Res.*, 49, 6449-6465.
261. Venekei I., Szilagyi L., Graf L., Rutter W. J. (1996) Attempts to convert chymotrypsin to trypsin. *FEBS Lett.*, 383, 143-147.
262. von Tappeiner H., Jesionek A. (1903) Therapeutische Versuche mit fluoreszierenden Stoffen. *Muench. Med. Wochenschr.* 47, 2042-2044.
263. von Tappeiner H., Jodlbauer A. (1907) Die Sensibilisierende Wirkung fluoriszierender Substanzen. *Gesammte Untersuchungen über die photodynamische Erscheinung.* F. C. W. Vogel, Leipzig.
264. von Tappeiner H., Jodlbauer A. (1904) Über Wirkung der photodynamischen (fluoreszierenden) Stoffe auf Protozoen und Enzyme. *Dtsch. Arch. Klin. Med.*, 80, 427-487.
265. Vrouenraets M. B., Visser G. W. M., Snow G. B., van Dongen G. A. M. S., (2003) Basic principles applications in oncology and improved selectivity of photodynamic therapy. *Anticancer Res.*, 23, 505-522.

266. Wagner J. R., Ali H., Langlois R., Brasseur N., van Lier J. E. (1987) Biological activities of phthalocyanines VI. Photooxidation of L-tryptophan by selectively sulfonated gallium phthalocyanines : singlet oxygen yield and effect of aggregation. *Photochem. Photobiol.*, 45, 587-594.
267. Weishaupt K. R., Gomer C. J., Dougherty T. J. (1976), Identification of singlet oxygen as the cytotoxic agent in photoinactivation of a murine tumor. *Cancer Res.*, 36, 2326-2329.
268. Williams A. T. R., Winfield S. A., Miller J. N. (1983) Relative fluorescence quantum yields using a computer controlled luminescence spectrometer. *Analyst*, 108, 1067-1071.
269. Wilson B. C., Patterson M. S., (2008) The physics, biophysics and technology of photodynamic therapy. *Phys. Med. Biol.*, 53, R61–R109.
270. Wollaston W. H. (1802) A Method of Examining Refractive and Dispersive Powers, by Prismatic Reflection. *Phil. Trans. Roy. Soc., London*, 92, 365-380.
271. Xu C., Guild J., Webb W. W., Denk W. (1995) Determination of Absolute 2-Photon Excitation Cross-Sections By in-Situ 2nd-Order Autocorrelation. *Opt. Lett.*, 20, 2372-2374.
272. Xu C., Webb W. W. (1996) Measurement of two-photon excitation cross sections of molecular fluorophores with data from 690 to 1050 nm. *J. Opt. Soc. Am. B*, 13, 481-491.
273. Zhou X., Ren A. M., Feng J. K., Liu X. J. (2004) Theoretical studies on the one- and two-photon absorption of tetrabenzoporphyrins and phthalocyanines. *Can. J. Chem.*, 82, 19-26.
274. Zipfel W. R., Williams R. M., Webb W. W. (2003) Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences. *Nat. Biotechnol.* 21, 1369-1377.